



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET
APPLIQUEE

Thèse de Doctorat en Sciences de la vie
Option : Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales

La peste porcine africaine à Madagascar :
évaluation de l'existence potentielle de
compartiments sauvages et de leurs impacts
épidémiologiques

Présentée par

RAVAOMANANA Julie

Titulaire d'un DEA en Ecologie Microbienne

Soutenue publiquement le Lundi 03 Octobre 2011 devant les membres de jury :

Président de jury

Professeur JEANNODA Victor

Directeur de thèse

Professeur ANDRIANTSIMAHAVANDY Abel

Co-directeur de thèse

Docteur ROGER François

Rapporteur interne

Professeur RALAMBORANTO Laurence

Rapporteur externe

Professeur RAKOTOZANDRINDRAINY Raphaël

Examineurs

Professeur RAZANAMPARANY Julia Louissette

Professeur RASAMBAINARIVO Jhon



Département
 Recherches
 Zootechniques
 Vétérinaires



*Cette thèse a été réalisée sous la grâce du Seigneur
Jésus Christ. Que toute louange et gloire te
reviennent Seigneur !*

*Je dédie cette thèse à mon mari, à ma fille et à ma nièce Zosy à
qui je dois tout pour leur sacrifice pendant mes absences
perpétuelles. Je tiens à leur présenter mes sincères excuses et
qu'ils retrouvent ici mon entière gratitude.*

AVANT-PROPOS

Cette thèse a été financée par la fondation non gouvernementale britannique Wellcome Trust qui finance de nombreux projets de recherche en santé humaine et en santé animale. Elle a été réalisée dans le cadre d'un projet intitulé « Diagnostic, épidémiologie et contrôle du virus de la peste porcine africaine ».

A Madagascar, le projet s'appuyait sur plusieurs organismes malgaches partenaires : le FOFIFA, représenté par le Département de Recherches Zootechnique et Vétérinaire (DRZV), la Maison du Petit Elevage (MPE) représentée par l'association interprofessionnelle pour la filière à cycle court, et la Direction des Services Vétérinaires (DSV).

Plusieurs travaux ont été réalisés simultanément afin d'obtenir une image épidémiologique globale de la peste porcine africaine (PPA) : un volet portant sur l'étude de la PPA chez les porcs domestiques et un second, qui constitue cette étude, portant sur l'étude du cycle sauvage de la maladie. Dans le cadre de cette thèse, les travaux de terrain ont été réalisés durant trois années successives (2006-2008), pendant la saison sèche uniquement afin de faciliter l'accès aux sites d'étude.

Toutes les analyses de laboratoire ont été effectuées au CIRAD Baillarguet (Montpellier, France) au sein de l'Unité Mixte de Recherche « Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes » (UMR 15), au CISA/INIA Madrid (Espagne) et à l'IRNASA à Salamanque (Espagne) ; tandis que les analyses statistiques des données ont été réalisées au CIRAD Baillarguet au sein de l'Unité Mixte de Recherche « Animal et Gestion Intégrée des Risques » (UMR 22).

Ce travail a été également soutenu financièrement par le Service de Coopération et d'Actions Culturelles (SCAC) de l'Ambassade de France à Madagascar et par le CIRAD de Montpellier auxquels nous exprimons ici notre profonde reconnaissance.

Remerciements

Ce travail est le fruit de plusieurs années de recherche et je tiens à présenter mes sincères remerciements à toutes les personnes qui, à des titres divers, m'ont permis de le réaliser dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier vivement :

Le Professeur JEANNODA Victor, Responsable de la formation doctorale de la Faculté des Sciences qui nous a fait honneur de diriger et de présider le Jury de cette thèse malgré ses obligations.

Mes Directeurs de thèse, le Professeur ANDRIANTSIMAHAVANDY Abel, Président de l'Université d'Antananarivo et le Docteur ROGER François, Directeur de recherche au CIRAD Montpellier, qui ont bien voulu nous apporter leur aide précieuse et bienveillance dans l'élaboration de cette thèse.

Mes rapporteurs, le Professeur RALAMBORANTO Laurence et le Professeur RAKOTOZANDRINDRAINY Raphaël qui ont bien voulu apporter leurs critiques et leurs appréciations pour la validation de cette thèse.

Le Professeur RAZANAMPARANY Julia Louissette et le Professeur RASAMBAINARIVO Jhon pour avoir bien voulu faire partie du jury et m'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail malgré leurs lourdes occupations.

Le Docteur STACHURSKI Frédéric, chercheur à l'UMR 15 du CIRAD, qui a accordé un temps précieux à la lecture et la correction de ce manuscrit malgré ses occupations.

Mon encadreur principal le Docteur VIAL Laurence, chercheur à l'UMR 15 du CIRAD Montpellier. Je tiens à lui témoigner ma très grande reconnaissance pour son encadrement, et ses conseils donnés de main de maître malgré ses lourdes responsabilités.

Mon Co-encadreur le Docteur JORI Ferran du CIRAD pour son encadrement et ses conseils.

Cette thèse s'est déroulée en grande partie au Centre International de Recherche Agronomique et de Développement (CIRAD) à Montpellier France, et a été financée également par ce Centre de Recherche ; je tiens donc à exprimer ma gratitude

et mon plus profond respect au Directeur Général du CIRAD, et à tous les personnels de ce Centre de Recherche pour leur accueil chaleureux et pour m'avoir permis d'accomplir ce travail.

Je remercie également tous les personnels de l'Unité Mixte de Recherche UMR 22 et de l'UMR 15 du CIRAD Baillarguet, avec qui j'ai travaillé et partagé des moments difficiles et agréables ; retrouvez ici mon entière gratitude.

J'adresse aussi mes remerciements à la Direction Régionale du CIRAD à Madagascar ainsi qu'aux personnels responsables de la gestion financière des travaux de terrains.

Ce travail a été financé et réalisé dans le cadre du projet Wellcome Trust sur la peste porcine africaine ; je tiens à remercier plus particulièrement le Professeur Dirk PFEIFFER (Royal Veterinary College, Angleterre) coordinateur de ce projet ainsi que tous les personnels du projet pour leurs conseils et leur aide. Je remercie également le Professeur Linda DIXON (Pirbright, Angleterre), le Docteur Esther BLANCO (Madrid, Espagne) et le Docteur Ricardo SANCHEZ-PEREZ (Salamanque, Espagne) pour leur chaleureux accueil dans leurs laboratoires respectifs.

Cette thèse a pu également être réalisée grâce au financement apporté par l'Ambassade de France à Madagascar à travers le Service de Coopération et d'Actions culturelles (SCAC), que je remercie vivement.

Je ne dois pas oublier de remercier le gouvernement malgache ainsi que le Centre de Recherches Appliquées au Développement Rural ou FOFIFA à Madagascar et le Département de Recherches Zootechniques et Vétérinaires (DRZV) qui m'ont permis d'effectuer cette thèse dans les conditions satisfaisantes et m'ont soutenue aussi bien moralement que techniquement dans la réalisation de ce travail. Que ce travail soit le gage de notre sincère reconnaissance.

A tous les personnels du DRZV,

A toute ma famille,

A tous mes ami(e)s,

Et à tous ceux qui, de près ou de loin, ont participé à la réalisation de cette thèse, retrouvez ici ma pleine gratitude.

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

Publications

Julie Ravaomanana, Vincent Michaud, Ferran Jori, Abel Andriatsimahavandy, François Roger, Emmanuel Albina, Laurence Vial. First detection of African Swine Fever Virus in *Ornithodoros porcinus* in Madagascar and new insights into tick distribution and taxonomy. Parasites & Vectors 2010, 3:115, 9PP

J. Ravaomanana , F. Jori, L. Vial, R. Perez-Sanchez, E. Blanco, V. Michaud and F. Roger. Assessment of interactions between African swine fever virus, bushpigs (*Potamochoerus larvatus*), *Ornithodoros* ticks and domestic pigs in north-western Madagascar. Transboundary and Emerging Diseases 2011, 58(3), 247-254

Communications

Jori F., Vial L., **Ravaomanana J.**, Le Glaunec G., Etter E., Akakpo J., Sarr J., Costard S., Perez-Ricardo S. , Roger F. The role of wild hosts (wild pigs and ticks) in the epidemiology of African swine fever in West Africa and Madagascar. Proceedings of the 12th International conference of the Association of Institutions of Tropical Veterinary Medicine, 2007, Montpellier France

Vial L., **Ravaomanana J.**, Le Glaunec G., Karim Ndlaye R., Wieland B., Costard S., Etter E., Dixon L., Pfeiffer D., Roger F. Peste porcine africaine et tiques: Evaluation des risques d'émergence et de diffusion par des approches mécanistiques et éco-épidémiologiques. Communication à l'INRA Montpellier en 2007

Ravaomanana J., Vial., Jori., Roger F. Résultats préliminaires de l'étude épidémiologique du cycle sylvatique de la peste porcine africaine à Madagascar. Réunion annuelle du projet Wellcome Trust, 2006 à Montpellier, France

Ravaomanana J., Vial., Jori., Roger F. Les hôtes sauvages de la peste porcine africaine et leur risque sur la propagation de la maladie. Communication lors de la foire de la MPE à Antananarivo, 2006

Ravaomanana J., Vial., Jori., Michaud V., Roger F. Présentation de résultats de travaux de terrain et de laboratoire sur le cycle sauvage de la PPA, lors de réunion annuelle du Projet Wellcome Trust PPA à Madrid Espagne, 2007

Ravaomanana J., Vial., Jori., Michaud V., Blanco E., Perez-Sanchez R., Roger F. Epidemiologic role of Ornithodoros soft ticks and bushpig for African swine fever virus in Madagascar, réunion annuelle du Projet Wellcome Trust PPA à Pretoria, Afrique du Sud, 2009

LISTE DES ABBREVIATIONS

ASF : African Swine Fever

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADNr: Acide désoxyribonucléique ribosomal

ARN : Acide Ribonucléique

ACM: Analyse de Correspondance Multiple

AC: Analyse de Correspondance

Ag: Antigène

AC: Anticorps

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

ALGENEX : Alternative Gene Expression

AE: Assez élevé

BSA: Bovine Serum Albumin

BET: Bromure d'ethidium

BT: BootsTraps

CIRAD : Centre International de Recherches Agronomique et Développement

CNEVA : Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires

CISA: Centro Investigacion Sanidad Animal

CP: Contrôle positif

CN: Contrôle négatif

CENRADERU : Centre National de la Recherche Appliquée au Développement Rural

DSV : Direction des Services Vétérinaires

DRZV : Département de Recherches Zootechnique et vétérinaire

DO: Densité Optique

EA : échantillonnage aléatoire

EMEM: Eagle Minimum Essential Medium

ELISA: Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay

EDTA : Ethyle Diamine Tétra Acide

EC : effet cytopathique

EC : échantillonnage ciblé

EP : échantillonnage périphérique

EMVT : Elevage et Médecine Vétérinaire Tropicale

E: Elevé
EF: Extrêmement faible
FOFIFA : Foibe Fikarohana amin'ny Fampandrosoana ny eny Ambanivohitra
F: Faible
FAO: Food and Agriculture Organization
FTA : Technique des Anticorps Fluorescents
HAD₅₀/ml : Hemadsorption de 50% par millilitre
HA: hémadSORption
Ha: hectares
INIA: Instituto Nacional De Investigaciones Agraria
IRNASA: Instituto de Recursos Naturales Y Agrobiologia
ICTV : Comité international de la taxonomie des virus
IPI : Infectés Permanents Immunotolérants
IgM : Immunoglobuline M
IgG : Immunoglobuline G
IFI : Immunofluorescence indirecte
IFD: d'immunofluorescence directe
IHA: Institut of Animal Health
IS : Indice Sérologique
KOH: Hydroxyde de potassium
MPE : Maison du Petit Elevage
MEM : Minimum Essential Medium
MgCl₂: Chlorure de magnésium
ML: maximum de vraisemblance
mM : millimolaire
M: Minime
NJ: Neighbor-Joining
N1: Nymphe de stade 1
N3 : Nymphe stade 3
N4 : Nymphe stade 4
N5 : Nymphe Stade 5
nm: nanomètre
Na₂ CO₃ : Carbonate de sodium
Na HCO₃: Bicarbonate de sodium

Na₂HPO₄ : Phosphate disodique

N: Nulle

OPD : Ortho-Phényle-Diamine

OIE : Office International des Epizooties

PPA : Peste Porcine Africaine

PPC : Peste Porcine Classique

PCR: Polymerase Chain Reaction

PBS: Phosphate Buffered Saline

pbs: paires de base

P: Parcimonie

PE: Peu élevé

QN: Quasi-nulle

RVC : Royal Veterinary College

Rpm: revolution per minute (tour par minute)

R : Ratio

Se : sensibilité

Sp : spécificité

SI : Sensus lato

SS : Sensus stricto

S: Sérum à tester

SRAPAN : Service Régional d'Appui à la Production Animale

SGE: Saliva gland Extract

SGE-2-P: Saliva gland Extract-2- Phosphate

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

TAE: Tris Acetate EDTA

TBE: Tris-Borate-EDTA

TMB: Tetramethylbenzidine

TF: Très faible

TE: Très élevé

µm: micrometre

µl: microlitre

GLOSSAIRE

Lambo: Mot désignant le potamochère utilisé par les habitants des Hauts-Plateaux

Lambodia : Mot désignant le potamochère utilisé par les habitants de la région du Nord-ouest

Lamboala : Mot désignant le potamochère utilisé par les habitants de la région Est

Komanga : arbre du genre *Erythrophleum couminga*

Kongon'morima : tiques molles coureuses

Poroponjy : mot désignant les tiques molles

Vazimba : population de petite taille colonisant le lieu dit « sacré »

Lavaka : mot désigné pour indiquer les creux ou grands trous provoqués par l'érosion

Fokontany : ensemble de quartiers

Baiboho : sol humide et inondé pendant la saison de pluie

Lavaka : petite colline

Makoas : représentent une population originaire de la côte orientale de l'Afrique.

Tanety : massif

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|-----------------------------|
| Figure 1: Hypothèses de recherche concernant le cycle sauvage de la PPA à Madagascar | 1 |
| Figure 2: Structure générale du virion | Erreur ! Signet non défini. |
| Figure 3: Emplacement des différentes protéines dans le virion | 18 |
| Figure 4 : Cycle de transmission du virus de la PPA chez les différents hôtes (porc domestique, la tique molle et le potamochère) | 22 |
| Figure 5 : Les conséquences de l'infection du virus de la PPA chez les porcs | 25 |
| Figure 6 : Hémorragie et congestion des ganglions mésentériques | 28 |
| Figure 7 : Rein hémorragique | 28 |
| Figure 8 : Hypertrophie de la rate | 28 |
| Figure 9 : Hémorragies de l'intestin..... | 28 |
| Figure 10 : Principe d'immunofluorescence indirecte | 30 |
| Figure 11 : Distribution géographique de la PPA | 36 |
| Figure 12 : Situation et statut épidémiologique de la PPA dans les pays africains pendant les 4 dernières années (2005 - 2008) | 37 |
| Figure 13 : Phacochoère d'Afrique (<i>Phacochoerus africanus</i>) | 39 |
| Figure 14 : <i>Potamochoerus porcus</i> | 44 |
| Figure 15 : Distribution géographique de <i>Potamochoerus porcus</i> | 44 |
| Figure 16 : <i>Potamochoerus larvatus</i> | Erreur ! Signet non défini. |
| Figure 17 : Distribution géographique de <i>Potamochoerus larvatus</i> | 45 |
| Figure 18 : <i>Hylochoerus meinertzhageni</i> | 46 |
| Figure 19 : Distribution géographique de l'espèce <i>Sus scrofa</i> | 47 |
| Figure 20 : Un type de piégeage artisanal « kotona » à Beronono | 51 |
| Figure 21 : Un cycle de vie typique des tiques molles <i>O.moubata</i> | 54 |
| Figure 22 : Les trois zones d'étude | 69 |
| Figure 23 : Zone de Marovoay choisie pour l'étude des potamochères..... | 73 |
| Figure 24 : Aspirateur à feuilles adapté pour la collecte des tiques molles..... | 83 |
| Figure 25 : Plateau blanc pour collecter les débris et les poussières, pouvant contenir des tiques molles | 83 |
| Figure 26: Tique coupée dans la partie supérieure montrant l'emplacement des glandes salivaires | 86 |

| | |
|---|-----|
| Figure 27 : Glandes salivaires en formes de tubules blancs détachés | 86 |
| Figure 28 : <i>Ornithodoros porcinus spp</i> de différents stades collectées lors de cette étude | 98 |
| Figure 29 : Ferme infestée de tiques molles à Mahitsy | 98 |
| Figure 30 : Représentation graphique avec des coordonnées normales de 4 variables actives (points noirs) et 4 variables supplémentaires (points gris) sur les deux premiers facteurs F1 et F2 des ACM | 102 |
| Figure 31 : Arbre phylogénétique des séquences de l'ADNr 16S des tiques malgaches d'espèces <i>Ornithodoros porcinus</i> | 105 |
| Figure 32 : Types de porcheries traditionnelles | 110 |
| Figure 33 : Les matériels de prélèvement..... | 115 |
| Figure 34 : Résultats des sérums douteux et positif avec ELISA utilisant le kit ALGENEX | 125 |
| Figure 35 : Résultat du test « Western Blot » montrant un sérum positif | 125 |
| Figure 36 : Répartition des sérums de porc domestique selon les valeurs des indices sérologiques | 126 |
| Figure 37 : Méthode d'analyse de risque selon l'OIE | 134 |
| Figure 38 : Méthode d'appréciation du risque selon l'OIE (2007)..... | 141 |
| Figure 39 : Modèle événementiel de l'émission du virus de la PPA par la tique molle <i>Ornithodoros porcinus spp.</i> | 142 |
| Figure 40 : Modèle événementiel de l'exposition du porc domestique sain à la tique molle infectée..... | 143 |
| Figure 41 : Modèle événementiel de l'émission du virus par <i>Potamochoerus larvatus</i> | 152 |
| Figure 42 : Modèle événementiel de l'exposition du porc domestique sain au potamochère infecté. | 153 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 : Situation épidémiologique de la PPA dans les trois zones d'étude | 78 |
| Tableau 2 : Protocole et résultats de l'échantillonnage pour la recherche des tiques dans les fermes de porcs des trois zones d'étude à Madagascar | 95 |
| Tableau 3 : Description et fréquence des variables actives et des variables supplémentaires incluses dans l'ACM dans les zones d'étude | 101 |
| Tableau 4: Probabilité de non détection de virus de la PPA | 128 |
| Tableau 5 : Nouvelle grille de qualificatifs utilisés pour l'appréciation de la probabilité de survenue | 135 |
| Tableau 6 : Résultats du croisement entre probabilité d'émission et probabilité d'exposition | 136 |
| Tableau 7 : Notation proposée pour l'appréciation de chacun des critères des conséquences | 138 |
| Tableau 8 : Critères d'appréciation des conséquences en santé animale | 138 |
| Tableau 9 : Estimation qualitative du risque résultant du croisement de l'estimation qualitative de la probabilité de survenue (colonne) et de l'estimation qualitative des conséquences (ligne) | 139 |
| Tableau 10 : Résumé de l'appréciation de la probabilité de la présence des tiques molles <i>Ornithodoros porcinus spp.</i> dans les zones d'étude..... | 145 |
| Tableau 11 : Résumé des probabilités de différents événements constituant la probabilité de l'émission du virus par les tiques molles..... | 147 |
| Tableau 12 : Résumé de l'appréciation des probabilités des événements constituant la probabilité de l'exposition du porc domestique..... | 149 |
| Tableau 13 : Appréciation des conséquences sur la santé animale | 151 |

| | |
|---|-----|
| Tableau 14 : Récapitulatif des probabilités des évènements de l'émission..... | 156 |
| Tableau 15 : Récapitulatif des probabilités des évènements constituant le modèle événementiel de l'exposition du porc..... | 159 |
| Tableau 16 : Probabilités de conséquence de l'introduction du virus de la PPA via les potamochères | 161 |

SOMMAIRE

| | |
|---|----|
| INTRODUCTION | 8 |
| 1. La peste porcine africaine ou PPA: une maladie complexe d'importance en santé animale | 9 |
| 2. Madagascar : un observatoire idéal de la PPA... | 10 |
| 3. Projet de thèse sur la PPA à Madagascar | 11 |
| 4. Plan général de l'étude | 13 |
| PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE | 15 |
| Chapitre 1 : Généralités sur la peste porcine africaine (PPA) | 16 |
| 1. Agent pathogène | 16 |
| 1.1. Classification | 16 |
| 1.2. Structure et génome | 16 |
| 1.3. Résistance dans le milieu | 19 |
| 1.4. Transmission et réplication du virus de la PPA | 20 |
| 1.4.1. <i>Les différents modes de transmission</i> | 20 |
| 1.4.2. <i>Réplication et pathogénie</i> | 23 |
| 1.5. Signes cliniques de la PPA | 24 |
| 1.6. Lésions provoquées par la PPA | 26 |
| 1.7. Réponse immunitaire et protection chez le porc | 28 |
| 1.8. Diagnostic de la PPA | 29 |
| 1.8.1. <i>Diagnostic sérologique</i> | 29 |
| 1.8.2. <i>Diagnostic virologique</i> | 31 |
| 1.9. Prophylaxie et prévention de la PPA | 32 |
| 1.10. Répartition géographique et épidémiologie de la PPA | 33 |
| Chapitre 2 : Les réservoirs naturels et les vecteurs biologiques du virus de la PPA | 38 |
| 1. Les suidés sauvages | 38 |
| 1.1. Les phacochères (<i>Phacochoerus sp</i>) | 38 |
| 1.2. Les potamochères (<i>Potamochoerus sp</i>) | 41 |
| 1.3. Les hylochères (<i>Hylochoerus meinertzhageni</i>) | 46 |
| 1.4. Les sangliers (<i>Sus scrofa</i>) | 46 |
| 1.5. Cas particulier de Madagascar | 48 |
| 2. Les tiques molles du genre <i>Ornithodoros</i> | 51 |
| 2.1. Biologie et écologie des tiques ornithodores | 51 |

| | | |
|--|--|----|
| 2.1.1. | <i>Taxonomie et distribution géographique</i> | 51 |
| 2.1.2. | <i>Cycle de développement</i> | 53 |
| 2.1.3. | <i>Repas sanguin</i> | 55 |
| 2.1.4. | <i>Longévité</i> | 55 |
| 2.1.5. | <i>Habitats</i> | 56 |
| 2.1.6. | <i>Hôtes</i> | 56 |
| 2.1.7. | <i>Conditions climatiques de survie et de développement</i> | 58 |
| 2.2. | Les tiques molles <i>Ornithodoros</i> et la PPA | 59 |
| 2.2.1. | <i>Mise en évidence de l'association tique-virus</i> | 59 |
| 2.2.2. | <i>Interaction entre la tique molle et le virus</i> | 60 |
| 2.2.3. | <i>Prévalence d'infection chez la tique</i> | 61 |
| 2.2.4. | <i>Diversification du virus dans la tique</i> | 61 |
| 2.2.5. | <i>Modes de transmission du virus par la tique</i> | 62 |
| 2.2.5.1. | Entre porc domestique et tique | 62 |
| 2.2.5.2. | Entre phacochère et tique | 63 |
| 2.2.5.3. | Entre tiques molles | 63 |
| 2.3. | Spécificités sur la tique molle malgache <i>Ornithodoros porcinus spp.</i> | 63 |
| 2.3.1. | <i>Historique et distribution géographique</i> | 63 |
| 2.3.2. | <i>Classification et taxonomie</i> | 65 |
| 2.3.3. | <i>Association au virus de la PPA</i> | 66 |
| DEUXIEME PARTIE : ETUDE DES RÔLES DES HÔTES SAUVAGES DANS | | |
| L'EPIDEMIOLOGIE DE LA PPA | | 67 |
| Chapitre 1 : Les zones d'étude | | 68 |
| 1. La zone de Marovoay (Plan régional de développement, 2004, Région de Boeny) | | 70 |
| 1.1. | Localisation | 70 |
| 1.2. | Relief, hydrographie et pédologie | 70 |
| 1.3. | Climat et végétation | 70 |
| 1.4. | Agriculture et élevage | 70 |
| 1.5. | Présence de potamochères et de tiques molles | 71 |
| 2. La zone d'Ambatondrazaka (Plan régional de développement 2004, Région d'Alaotra Mangoro, 2005) | | 73 |
| 2.1. | Localisation | 73 |
| 2.2. | Relief, hydrographie et pédologie | 74 |
| 2.3. | Climat et végétation | 74 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.4. | Agriculture----- | 74 |
| 2.5. | Pisciculture et élevage ----- | 75 |
| 2.6. | Présence de potamochères et de tiques molles ----- | 76 |
| 3. | La zone d'Arivonimamo (Plan régional de développement, 2004, Région d'Itasy) | 76 |
| 3.1. | Localisation----- | 76 |
| 3.2. | Relief, hydrographie, pédologie et végétation----- | 76 |
| 3.3. | Climat ----- | 76 |
| 3.4. | Agriculture et élevage----- | 77 |
| 3.5. | Présence de potamochères et de tiques molles ----- | 78 |
| | Zone de référence pour la présence de tiques: Mahitsy ----- | 79 |
| | Chapitre 2 : Etude du rôle des tiques molles ornithodores dans l'épidémiologie de la PPA à Madagascar ----- | 80 |
| 1. | Objectifs ----- | 80 |
| 2. | Matériel et méthode ----- | 80 |
| 2.1. | La collecte de données ----- | 81 |
| 2.1.1. | <i>Collecte de tiques dans les porcheries</i> ----- | 81 |
| 2.1.1.1. | Echantillonnage----- | 81 |
| 2.1.1.2. | Méthodes de collecte (Voir Annexe 9)----- | 82 |
| 2.1.1.3. | Mode de conservation des tiques----- | 83 |
| 2.1.2. | <i>Description de la structure et des traitements réalisés dans les bâtiments d'élevage</i> | 84 |
| 2.2. | Les analyses des échantillons et des données----- | 84 |
| 2.2.1. | <i>Test sérologique des sérums de porcs domestiques</i> ----- | 84 |
| 2.2.2. | <i>Analyse moléculaire des tiques</i> ----- | 88 |
| 2.2.2.1. | Préparation de l'homogénat----- | 88 |
| 2.2.2.2. | Extraction d'ADN ----- | 88 |
| 2.2.2.3. | Amplification d'ADN----- | 89 |
| 2.2.3. | <i>Analyse phylogénétique</i> ----- | 92 |
| 2.2.4. | <i>Analyse statistique des questionnaires aux éleveurs</i> ----- | 93 |
| 3. | Résultats ----- | 93 |
| 3.1. | Présence de la tique <i>O. porcinus spp</i> dans les porcheries malgaches ----- | 93 |
| 3.1.1. | <i>Tiques collectées d'après le résultat de l'ELISA anti-tique dans les 3 zones d'étude-</i> | 93 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 3.1.2. | <i>Tiques collectées d'après les collectes historiques réalisées dans la zone d'Antananarivo</i> | 96 |
| 3.1.3. | <i>Tiques collectées dans les zones de Marovoay et d'Ambatondrazaka où aucune suspicion a priori n'était possible</i> | 99 |
| 3.2. | Facteurs de présence d' <i>O.porcinus spp</i> dans les porcheries | 99 |
| 3.3. | Identification moléculaire et phylogénie d' <i>O. porcinus spp</i> | 103 |
| 3.3.1. | <i>Phylogénie de la tique O.porcinus spp</i> | 103 |
| 3.3.2. | <i>Détection du virus de la PPA chez O. porcinus spp.</i> | 106 |
| 3.3.2.1. | Amplification de l'ADNr 16S de tique | 106 |
| 3.3.2.2. | Amplification du gène VP72 du virus de la PPA | 106 |
| 4. | Discussion | 107 |
| 5. | Conclusion | 111 |
| | Chapitre 3 : Etude du rôle de <i>Potamochoerus larvatus</i> dans l'épidémiologie de la PPA à Madagascar | 113 |
| 1. | Objectifs | 113 |
| 2. | Matériel et méthode | 113 |
| 2.1. | Collecte des données | 113 |
| 2.1.1. | <i>Détermination du nombre d'échantillons de potamochère à étudier</i> | 113 |
| 2.1.2. | <i>Collecte des prélèvements</i> | 114 |
| 2.2. | Analyses des prélèvements au laboratoire | 115 |
| 2.2.1. | <i>Analyse virologique par la réaction d'amplification du gène de virus de la PPA</i> | 116 |
| 2.2.1.1. | Analyse des échantillons de sang sur papiers filtres 3MM et les papiers buvards FTA de potamochères | 116 |
| 2.2.1.2. | Analyse d'échantillons de rate de potamochères | 118 |
| 2.2.2. | <i>Analyse sérologique des sérums de potamochères et de porcs domestiques</i> | 120 |
| 2.2.2.1. | Tests sérologiques pour la détection d'anticorps dirigés contre le virus de la PPA | 120 |
| a) | Test ELISA utilisant la protéine recombinante p30 | 120 |
| b) | Test ELISA utilisant le kit INGENASA (« blocking ELISA ») | 121 |
| c) | Test « Western Blot » ou « immuno-blotting » utilisant la protéine recombinante p30 | 122 |
| 2.2.2.2. | Tests sérologiques pour la détection de l'anticorps anti-tique <i>O.moubata</i> | 123 |
| 3. | Résultats | 123 |

| | | |
|---|---|-----|
| 3.1. | Résultats d'analyse virologique par PCR des prélèvements de potamochères----- | |
| ----- | 123 | |
| 3.2. | Résultats d'analyse sérologiques des sérums de porcs domestiques et de potamochères----- | 123 |
| 3.2.1. | <i>Résultats du test ELISA pour la détection d'anticorps dirigé contre le virus de la PPA chez les potamochères</i> ----- | 123 |
| 3.2.2. | <i>Résultats du test ELISA pour la détection d'anticorps dirigé contre le virus de la PPA chez les porcs domestiques</i> ----- | 123 |
| 3.2.2.1. | Résultat des sérums des porcs domestiques en ELISA utilisant le kit INGENASA ----- | 124 |
| 3.2.2.2. | Résultat des sérums des porcs domestiques en ELISA (ALGENEX) utilisant la protéine recombinante p30 ----- | 124 |
| 3.2.2.3. | Résultat des sérums des porcs domestiques en « Western Blot » ou « immuno- blotting » utilisant la protéine recombinante p30 ----- | 124 |
| 3.2.3. | <i>Résultats du test ELISA pour la détection d'anticorps anti- tique O. moubata chez les porcs et chez les potamochères</i> ----- | 126 |
| 4. | Discussion ----- | 127 |
| 5. | Conclusion ----- | 130 |
| TROISIEME PARTIE : ANALYSE DE RISQUE DE TRANSMISSION DU VIRUS DE LA PPA AU PORC DOMESTIQUE PAR LES HÔTES SAUVAGES A MADAGASCAR ----- | | |
| | | 131 |
| 1. | Introduction ----- | 132 |
| 1.1. | Rappel ----- | 132 |
| 1.2. | Définitions ----- | 132 |
| 2. | Objectifs ----- | 133 |
| 3. | Méthodologie ----- | 133 |
| 3.1. | L'appréciation de l'émission----- | 134 |
| 3.2. | L'appréciation de l'exposition----- | 134 |
| 3.3. | L'appréciation de la probabilité de survenue ou émergence du danger ----- | 134 |
| 3.3.1. | <i>Principes de croisement des probabilités de l'émission et de l'exposition</i> ----- | 135 |
| 3.3.2. | <i>Règles pour les probabilités cumulées (AFSSA, 2008)</i> ----- | 136 |
| 3.4. | L'appréciation des conséquences ----- | 137 |
| 3.5. | L'estimation du risque ----- | 138 |
| 4. | Résultats ----- | 141 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 4.1. | Identification du danger et définition du risque ----- | 141 |
| 4.2. | Appréciation du risque de transmission du virus de la PPA aux porcs domestiques par les tiques molles ----- | 142 |
| 4.2.1. | <i>Construction de modèles événementiels ou « Pathways » d'introduction du virus de la PPA par les tiques molles -----</i> | 142 |
| 4.2.1.1. | Modèle événementiel de l'émission ----- | 142 |
| 4.2.1.2. | Modèle événementiel de l'exposition ----- | 143 |
| 4.2.2. | <i>Appréciation de la probabilité d'émission du virus par les tiques molles -----</i> | 143 |
| 4.2.2.1. | Probabilité de présence de la tique molle <i>O. porcinus spp</i> dans les zones étudiées----- | 144 |
| 4.2.2.2. | Probabilité d'infection de la tique molle <i>O. porcinus spp</i> ----- | 145 |
| 4.2.2.3. | Probabilité pour que la tique molle <i>O. porcinus spp</i> soit infectante ----- | 146 |
| 4.2.3. | <i>Probabilité de l'exposition du porc au virus via la tique molle -----</i> | 147 |
| 4.2.3.1. | Probabilité pour qu'un porc sain soit en contact avec la tique infectée----- | 147 |
| 4.2.3.2. | Probabilité pour qu'un porc sain devienne infecté par la pique de la tique infectée----- | 148 |
| 4.2.4. | <i>Probabilité de survenue du danger par les tiques molles-----</i> | 149 |
| 4.2.5. | <i>Conséquences de l'introduction du virus par les tiques molles-----</i> | 149 |
| 4.2.5.1. | Les conséquences sanitaires et économiques pour un élevage----- | 150 |
| 4.2.5.2. | Les conséquences en terme de diffusibilité de la PPA ----- | 150 |
| 4.2.5.3. | Répercussions économiques nationales et/ou internationales----- | 150 |
| 4.2.6. | <i>Estimation du risque d'introduction du virus de la PPA par les tiques molles-----</i> | 151 |
| 4.3. | Appréciation du risque d'introduction du virus de la PPA chez les porcs domestiques par les potamochères ----- | 151 |
| 4.3.1. | <i>Construction des modèles événementiels d'introduction du virus de la PPA par les potamochères-----</i> | 151 |
| 4.3.1.1. | Modèle événementiel de l'émission ----- | 151 |
| 4.3.1.2. | Modèle événementiel de l'exposition ----- | 152 |
| 4.3.2. | <i>Appréciation de la probabilité de l'émission du virus par les potamochères-----</i> | 154 |
| 4.3.2.1. | Probabilité de présence de potamochères dans les zones étudiées ----- | 154 |
| 4.3.2.2. | Probabilité d'infection du potamochère----- | 155 |
| 4.3.2.3. | Probabilité pour que le potamochère soit infectant----- | 155 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 4.3.3. | <i>Probabilité de l'exposition du porc sain au potamochère infecté</i> | 156 |
| 4.3.3.1. | Probabilité pour qu'un porc soit en divagation totale | 156 |
| 4.3.3.2. | Probabilité pour qu'un porc fréquente la forêt | 157 |
| 4.3.3.3. | Probabilité de contact entre le potamochère infecté et le porc sain | 157 |
| 4.3.4. | <i>Probabilité de survenue du danger</i> | 160 |
| 4.3.5. | <i>Appréciation des conséquences</i> | 160 |
| 4.3.5.1. | Les conséquences sanitaires et économiques pour un élevage | 160 |
| 4.3.5.2. | Les conséquences en terme de diffusibilité de la PPA | 160 |
| 4.3.5.3. | Répercussions économiques nationales | 160 |
| 4.3.6. | <i>Le risque d'introduction du virus par les potamochères</i> | 161 |
| 5. | Discussion | 161 |
| 6. | Conclusion | 164 |
| | DISCUSSION GENERALE | 165 |
| | CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES | 169 |
| | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 172 |
| | ANNEXES | 180 |

INTRODUCTION

Figure 1

1. La peste porcine africaine ou PPA: une maladie complexe d'importance en santé animale

La peste porcine africaine (PPA) est une affection virale contagieuse des suidés sauvages et domestiques. Elle est causée par un virus de la famille des Asfaviridae qui peut se transmettre directement par contact d'un animal infecté à un animal sain ou par de viande contaminée, et indirectement par contact avec tout matériel souillé par le virus (Wilkinson, 1989 ; Penrith et al, 2004).

Le porc domestique et le sanglier (*Sus scrofa*) sont dits sensibles à la maladie car ils développent des symptômes. La maladie est généralement d'allure épizootique avec des symptômes oculaires, digestifs, respiratoires et nerveux et des lésions hémorragiques très caractéristiques (Plowright et al, 1994; Penrith et al, 2004). Elle présente une forte morbidité et mortalité chez les porcs domestiques, atteignant parfois jusqu'à 100% de l'effectif (Arias et al, 2002 ; Babalobi et al, 2007). En revanche, les suidés sauvages d'Afrique comme les phacochères (*Phacochoerus spp*), les potamochères (*Potamochoerus spp*) et les hylochères (*Hylochoerus meinertzhageni*) font une infection inapparente et jouent le rôle de réservoirs naturels du virus de la PPA (Oura et al, 1998 ; Anderson, 1998 ; Luther, 2007).

Outre les hôtes vertébrés, le virus de la PPA est capable d'infecter et de se maintenir dans des tiques molles (Argasidae) ornithodores et d'être transmis par ces dernières aux hôtes vertébrés. Il peut également passer de tique à tique par transmission transovarienne, vénérienne ou par hyper-parasitisme (Hess, 1981 ; Plowright, 1974 ; Rennie, 2001). Les cycles domestique et sauvage, ainsi que leurs éventuelles interactions, ont été décrits en Afrique australe et orientale, de même qu'en Espagne et au Portugal où le rôle des tiques, comme hôtes du virus, a été clairement identifié. Il n'en est pas encore le cas en Afrique de l'Ouest, en Afrique Centrale et à Madagascar.

Actuellement, la PPA est l'une des maladies les plus graves des porcs domestiques par sa forte contagiosité et sa capacité de se maintenir dans des réservoirs naturels sauvages. C'est la raison pour laquelle elle fait partie des maladies de la liste A de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale, anciennement Office International des Epizooties (OIE) : elle correspond ainsi à une « maladie transmissible à grand pouvoir de diffusion et d'une gravité particulière, susceptible de s'étendre au-delà des frontières nationales, dont les conséquences économiques ou sanitaires sont graves, et dont l'incidence sur les échanges internationaux d'animaux et des produits d'origine animale est très importante ». Le tableau clinique ne présentant aucun signe

pathognomonique, seul le diagnostic de laboratoire permet de confirmer que le virus de la PPA est à l'origine des symptômes observés, ce qui complique la détection et la déclaration rapide de la maladie. Actuellement, il n'existe aucun traitement ni vaccin contre le virus de la PPA et le contrôle de la maladie est essentiellement basé sur le diagnostic précoce et l'application de mesures sanitaires strictes (**Sanchez-Vizcaino, 2006**). Dans ces conditions, une connaissance détaillée de l'épidémiologie de la maladie est fondamentale, afin de pouvoir mettre en place des mesures de contrôle efficaces.

2. Madagascar : un observatoire idéal de la PPA...

Le cas particulier de Madagascar est intéressant car la PPA y a été introduite récemment en 1997 à partir de la région de Taolagnaro (**Rousset et al, 2001**), et l'on suppose de façon unique (**Bastos et al, 2003**). Il a été possible de suivre son statut épidémiologique depuis son introduction.

L'épizootie s'est ensuite propagée très rapidement vers d'autres régions, notamment vers les Hautes Terres en suivant les grands axes de communication du pays. Le résultat d'analyse des échantillons envoyés en 1998 au laboratoire de Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires (CNEVA) de Maisons-Alfort à Paris, a révélé la présence de virus de la PPA à Madagascar (**Gonzague et al. 2001**). D'après l'étude phylogénétique effectuée par Bastos en 2003, ce virus serait génétiquement proche du virus du Mozambique. Depuis, la PPA s'est installée de manière enzootique dans l'île où l'on note l'apparition régulière mais sporadique de foyers dans de nouveaux élevages ou dans des élevages ayant déjà été infectés. Actuellement toutes les régions du pays sont infectées par la maladie.

L'introduction du virus de la PPA dans le pays a engendré des pertes économiques extrêmement importantes (**Rousset et al, 2001**) par la mortalité des porcs malades, l'abattage sanitaire des porcs sains présents dans les cheptels infectés ainsi que par une profonde désorganisation de la filière porcine. On estime qu'entre 1997 et 1999, 50% du cheptel porcin malgache a été décimé.

Le fait qu'à Madagascar la PPA se soit installée de façon durable après son introduction pourrait permettre de supposer, comme en Afrique orientale et australe d'où elle provient, l'existence d'un cycle sauvage de transmission de la maladie. En effet, il existe un suidé sauvage à Madagascar : le potamochère (*Potamochoerus larvatus*) - *lamboala* en malgache -, proliférant dans de nombreuses zones du pays et pouvant rentrer en contact avec des porcs domestiques au niveau de zones d'interface en périphérie des forêts où il habite (**CIRAD, 2006**). Il pourrait être sensible au virus de la PPA et avoir été contaminé à partir des porcs

domestiques malades suite à l'introduction du virus en 1997. Toutefois, l'infection naturelle du potamochère malgache par le virus de la PPA n'a jamais été démontrée jusqu'à présent. En outre, une espèce de tiques molles appartenant au complexe d'espèces *O. moubata*, connu en Afrique australe et orientale comme le vecteur et un des réservoirs pour le virus de la PPA, est également présente dans des élevages porcins de Madagascar, entre autres certains de ceux touchés par la PPA depuis 1997 (**Roger et al, 2001**). Toutefois, il n'a jamais été prouvé que le virus de la PPA puisse être hébergé par cette tique et que cette dernière puisse le transmettre à des suidés sauvages et/ou domestiques. Par conséquent, la mise en place de recherches pour évaluer le rôle des hôtes sauvages potentiels de la maladie à Madagascar est fondamental pour pouvoir établir des mesures de lutte et de contrôle plus efficaces contre cette maladie dans le pays. Ainsi, le Centre National de Recherches Appliquées au Développement Rural (CENRADERU) ou FOFIFA a-t-il décidé de mettre en œuvre des activités de recherche sur le cycle sauvage de la PPA dans l'Ile dans le cadre d'une thèse de doctorat réalisée au sein du Département de Recherches Zootechnique et Vétérinaire (DRZV) à Ampandrianomby Antananarivo.

3. Projet de thèse sur la PPA à Madagascar

L'objectif global de cette thèse consiste à confirmer l'existence ou non de compartiments sauvages pour le virus de la PPA à Madagascar, d'évaluer les possibilités de contact entre ces compartiments (porc-tique, porc-potamochère et tique-potamochère) (Figure 1), de déduire le rôle des tiques et des potamochères sur le maintien et la transmission de la maladie et d'estimer les risques éventuels d'introduction du virus aux porcs via ces hôtes sauvages.

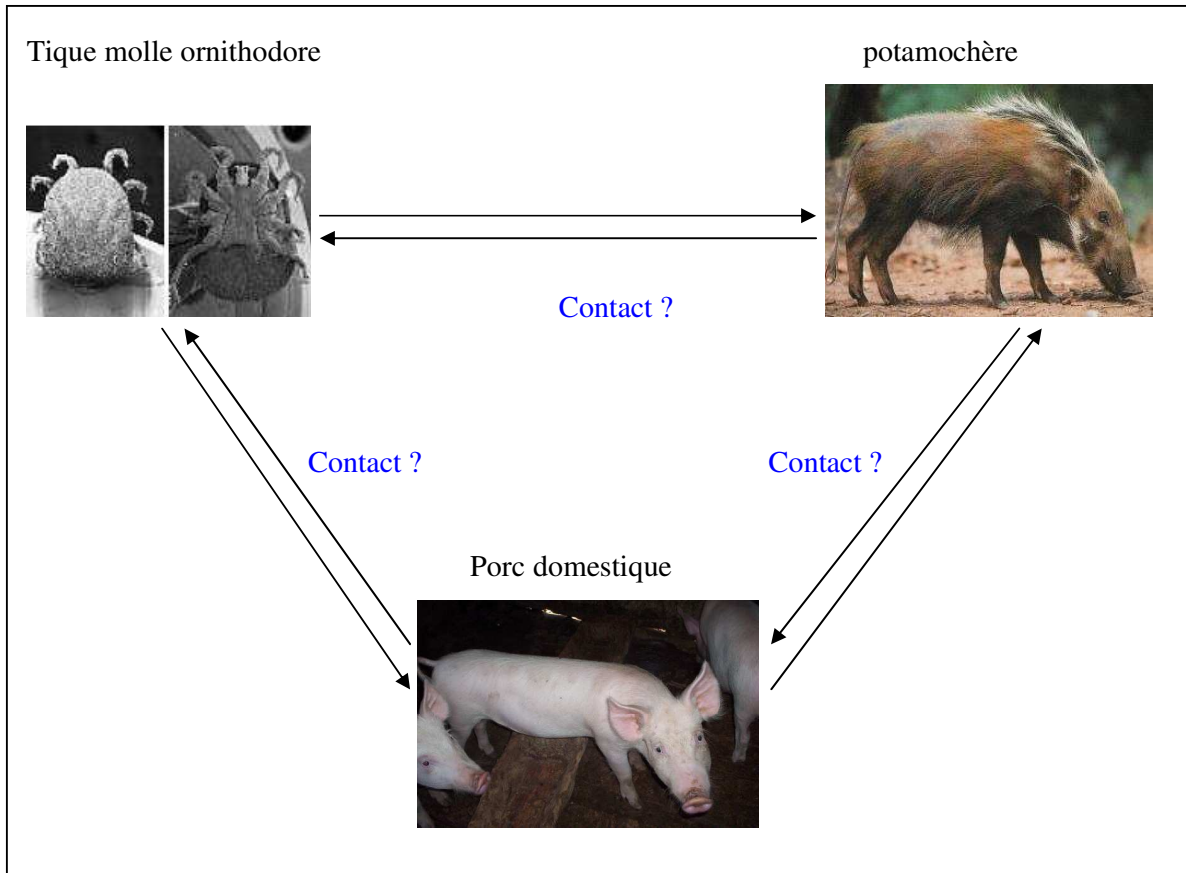


Figure 1: Hypothèses de recherche concernant le cycle sauvage de la PPA à Madagascar

4. Plan général de l'étude

Introduction

Contexte général de l'étude

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur la PPA

Chapitre II : Les hôtes sauvages de la PPA

- Les suidés sauvages
- Les tiques molles ornithodores

Partie II : Etude des rôles des hôtes sauvages dans l'épidémiologie de la PPA à Madagascar

Chapitre I : Les zones d'étude

Chapitre II : Etude du rôle de la tique molle *Ornithodoros*

Objectifs de l'étude

Matériel et méthode

- Collecte des données
- Analyses des échantillons et des données

Résultats

Discussions

Conclusion

Chapitre III : Etude du rôle de *Potamochoerus larvatus*

Objectifs de l'étude

Matériel et méthode

- Collecte des données
- Analyse des échantillons

Résultats

Discussions

Conclusion

Partie III: Analyse de risque de transmission du virus de la PPA au porc domestique par les hôtes sauvages à Madagascar

Objectifs de l'étude

Méthodologie

Appréciation de l'émission

Appréciation de l'exposition

Appréciation de la probabilité de survenue du danger

Appréciation des conséquences

Estimation du risque

Résultats

Appréciation du risque de transmission du virus de la PPA au porc par les tiques molles

Appréciation du risque de transmission du virus de la PPA au porc par les potamochères

Discussions

Conclusion

Discussion générales, conclusions générales et perspectives

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Généralités sur la peste porcine

africaine (PPA)

1. Agent pathogène

1.1. Classification

L'agent pathogène responsable de la PPA est un virus qui, au microscope électronique apparaît sous forme d'une particule à symétrie icosaédrique (**Carrascosa et al, 1984**) (Figure 2). Ce virus a longtemps été classé parmi les *Iridovirus*. Cependant, certaines caractéristiques uniques à sa structure, ainsi que l'examen de son génome, ont amené le Comité international de la taxonomie des virus (ICTV) à créer la nouvelle famille: *Asfarviridae* (African swine fever and related viridae) dans laquelle le virus de la PPA est l'unique représentant et inclus au nouveau du genre *Asfivirus* (**Dixon et al, 2005**). Avec une organisation génomique très similaire à celle des poxvirus, il ne présente pas le même tropisme puisque l'*Asfivirus* se multiplie dans le cytoplasme des cellules hôtes contrairement aux poxvirus. Enfin, les caractéristiques communes du virus de la PPA et d'autres grands virus à ADN à réplication intra cytoplasmique suggèrent un ancêtre commun pour tous ces virus. Ils forment le groupe des virus à ADN nucléo-cytoplasmiques qui regroupent les familles *Poxviridae*, *Iridoviridae*, *Phycodnaviridae* et *Mimiviridae* (**Iyer et al, 2006**). Toutefois, le virus de la PPA représente le seul virus à ADN connu transmis par des arthropodes (**Wardley et al, 1983**).

1.2. Structure et génome

Les virions de la PPA présentent une structure complexe à plusieurs couches (**Carrascosa et al, 1984**) (Figure 2). Ils sont composés d'un cœur de 80 nm contenant le génome du virus au sein d'un nucléide de 30 nm (formant le système de nucléoprotéine), entouré d'une première couche lipidique (double enveloppe interne) puis d'une couche protéique (enveloppe externe) formant la capside icosaédrique de 170 à 190 nm de diamètre. La capside résulte de l'assemblage de capsomères hexagonaux : 1892 à 2172 capsomères forment une particule virale mûre, c'est-à-dire prête au bourgeonnement des virions. Le diamètre final des virions est de 175 à 215 nm.

Le génome du virus est un ADN linéaire double brin de 170 000 à 190 000 nucléotides, selon les souches (**Blasco et al, 1989**). Le séquençage complet du génome viral a permis d'identifier 150 gènes potentiels répartis sur les deux brins du génome (**Dixon et al, 1994**)

(**Yanez et al. 1995**). L'analyse biochimique des virions a dénombré 54 protéines de structure de poids moléculaire compris entre 10 000 et 150 000 Da (**Carascosa et al, 1985**). Les protéines d'attachement p12 et p24 sont retrouvées sur la membrane externe des particules virales tandis que les protéines p150, p37, p34 et p14 (résultant du clivage de la polyprotéine pp220) sont rencontrées au cœur même du virus (

Figure 3). La protéine VP72 (codée par le gène B646L) n'est pas une protéine de membrane (**Cobbold et Wileman, 1998**) mais elle est la composante principale de la capside virale qui entoure l'enveloppe interne du virus. Enfin, une protéine de membrane majeure est la p54, codée par le gène E183L et localisée dans l'enveloppe externe du virus. L'enveloppe externe contient également une glycoprotéine très importante dans la virulence du virus : le CD2v (codée par le gène EP402R) (**Ruiz-Gonzalvo et al, 1996**). Cette protéine est impliquée dans la propriété hémadsorbante du virus. L'hémadsorption repose sur le fait que certains isolats du virus de la PPA présentent la capacité d'adhérer aux érythrocytes de porcs ce qui favorise leur dispersion de façon systémique dans l'organisme. Le virus infecte préférentiellement les monocytes et les macrophages et présente un tropisme exclusif pour les cellules porcines (**Wardley et al, 1977, Minguez et al, 1988**). Lorsque ce virus infecte ces monocytes ou ces macrophages, on observe l'association de ces cellules aux érythrocytes. Cette propriété hémadsorbante entre dans les critères de distinction des différents isolats du virus de la PPA ainsi que dans leur classification.

La souche malgache semble être non hémadsorbante et non cytopathique (**Gonzague et al, 2001**). D'après les phylogénies réalisées à partir de l'amplification du gène codant pour la VP72, elle appartient au même génotype II que les souches de Géorgie 2007, de Mozambique 2002, 2005 et de Zambie 1993 (**Rowlands et al, 2007**).

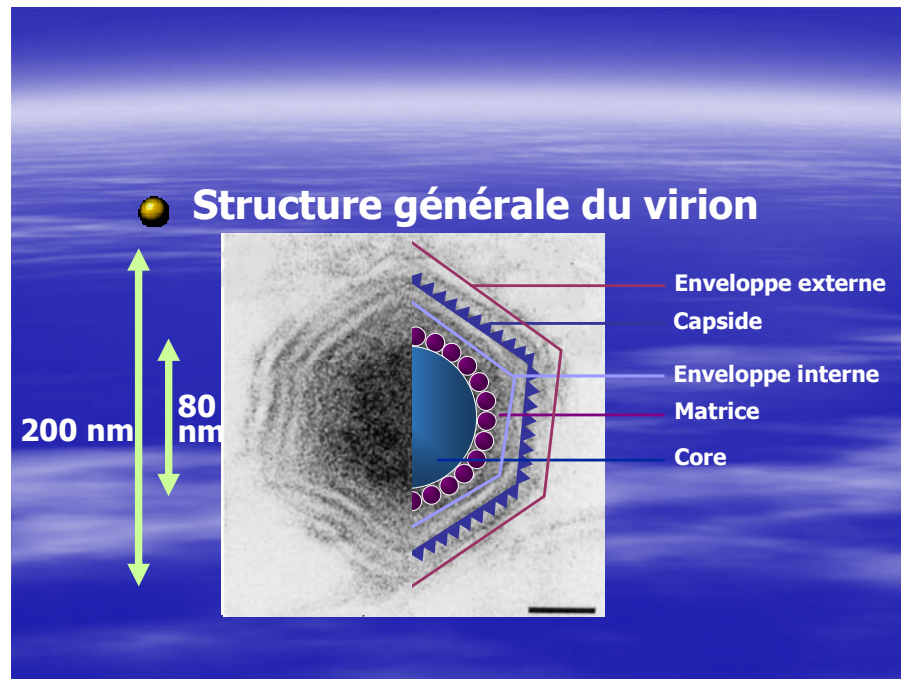


Figure 2: Structure générale du virion

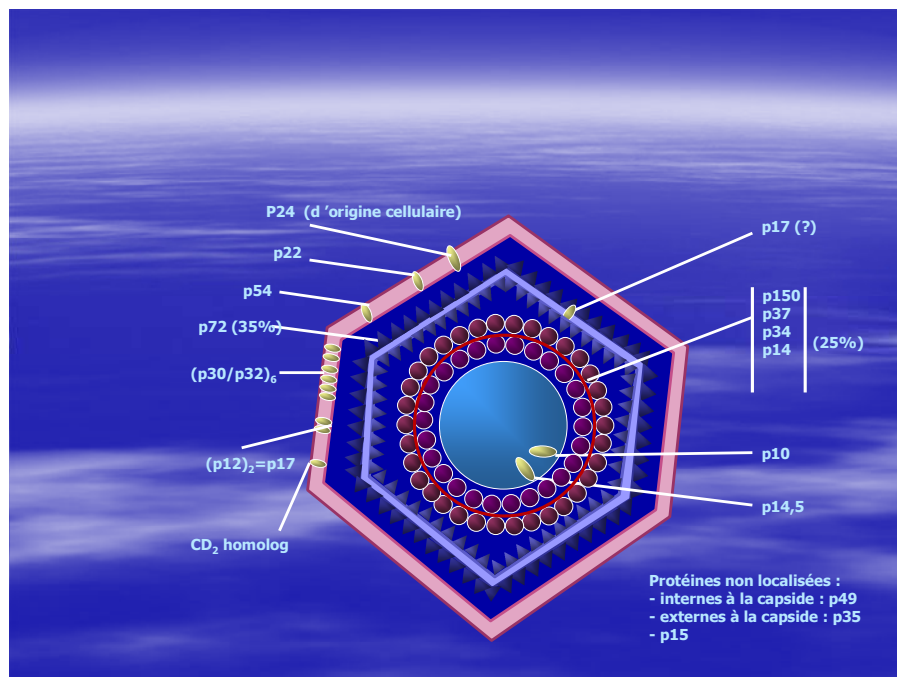


Figure 3: Emplacement des différentes protéines dans le virion

1.3. Résistance dans le milieu

Une des caractéristiques fondamentales du virus de la PPA est sa résistance et sa persistance prolongées dans le milieu extérieur et dans les milieux biologiques. Le virus est résistant aux changements de pH qui se produisent pendant la maturation de la viande, d'où sa présence possible dans les carcasses de porcs contaminés et les produits dérivés. Théoriquement, le virus est le plus stable entre pH=4 et pH=10. Cependant selon le matériel organique considéré, le pouvoir infectieux du virus peut être encore démontré dans du sérum de porc après 22h à pH = 3,1, après 3 jours à pH= 3,9 et après une semaine à pH =13,4.

Le virus peut résister 15 semaines dans du sang pourri, 11 jours dans des fèces maintenues à température ambiante, 18 mois dans du sang de porc conservé à 4°C, 150 jours dans de la viande désossée gardée à 4°C, et 140 jours dans du jambon sec salé. Des auteurs ont également rapporté la persistance du virus pendant 104 jours à -4°C dans du muscle squelettique, et pendant 6 mois dans de la moelle osseuse à -4°C (**Kowalenko et al, 1965**). Enfin, le pouvoir infectieux du virus pourrait persister pendant 5 à 6 mois dans des viandes congelées et pendant plus de 2 ans dans de la rate infectée à -70°C (un des organes de prédilection du virus durant sa multiplication chez ses hôtes sensibles et réservoirs) (**Wilkinson, 1989**), (**Crucière, 2003**). Dernièrement, il a été signalé une persistance du virus jusqu'à 6 ans à 5°C dans l'obscurité dans du milieu de culture EMEM (Eagle Minimum Essential Medium) et 18 mois dans du sérum à la température ambiante, un mois à 37°C et 3h1/2 à 56°C.

Hautement résistant aux températures élevées, le virus de la PPA est néanmoins inactivé en 30 minutes à 60°C (**Plowright et al, 1967**). En outre, une étude a montré les effets virucides de désinfectants à base de chlore (concentrations de 0,03% à 0,0075%), d'iode (concentrations de 0,015% à 0,0075%) et d'ammonium quaternaire (concentration de 0,003%) (**Shirai et al, 1999**). Le virus est aussi très sensible aux solvants et aux détergents des lipides, ainsi qu'aux agents oxydants comme l'hypochlorite et le phénol. La bêta-propiolactone, l'acétyl-éthylène et le glycéraldéhyde inactivent le virus dans un délai d'une heure à 37°C. Le virus vit pendant 4 jours dans la formaline à 0,5%. Par contre, le virus de la PPA s'est avéré résistant aux nucléases et aux protéases telles que la trypsine ou la pepsine (**Bengis 1997; Farez et Morley, 1997; Plowright and Parker, 1967; Plowright et al, 1994**).

1.4. Transmission et réplication du virus de la PPA

1.4.1. *Les différents modes de transmission*

Le virus de la PPA peut être transmis de porc malade à porc sain (Figure 4) directement par voie orale, nasale, oculaire, par scarification cutanée, par voie intramusculaire, intraveineuse, sous-cutanée ou intra-péritonéale (**Penrith et al, 2004**) ; (**Mc Vicar et al, 1984**). Chez l'animal contaminé, le virus est présent dans le sang et toutes autres sécrétions et excréments (conjonctivales, génitales, urinaires et fécales). Compte tenu de la grande résistance du virus de la PPA dans l'environnement extérieur et dans les milieux biologiques, sa transmission de porc à porc peut aussi avoir lieu indirectement via un vecteur mécanique tel que les locaux, les véhicules, les instruments ou les vêtements souillés (**Crucière, 2003 ; Wilkinson, 1989 ; Sanchez-Vizcaino, 1992**) ou par la consommation par un porc sain de viande de porc contaminée (Figure 4) quelle que soit sa forme et son mode de conservation (**Wilkinson, 1989**).

Le virus de la PPA peut enfin être transmis à un porc par la piqure d'un vecteur biologique : les tiques molles du genre *Ornithodoros* dont certaines espèces constituent aussi des réservoirs naturels du virus (Figure 4). Colonisant indifféremment les terriers et d'autres habitats des suidés sauvages en milieu naturel, et les fissures et fondations des porcheries en milieu domestique, ces tiques peuvent transmettre le virus de la PPA d'un porc infecté à un porc sain, d'un suidé sauvage réservoir à un ses congénères, ou encore d'un suidé sauvage à un porc domestique et ainsi permettre le passage du virus du cycle dit « sauvage » de la maladie au cycle « domestique » de transmission (Figure 4).

Chez la tique elle-même, la transmission du virus d'une tique infectée à une autre tique peut se faire de manière trans-stadiale, transovarienne et transsexuelle (Figure 4). Dans la transmission trans-stadiale, l'infection contractée persiste de stade en stade durant le développement de la tique, par exemple du stade larvaire au stade nymphal jusqu'au stade adulte. Dans le cas des transmissions transovarienne et transsexuelle, la contamination se produit d'une tique à une autre. Dans le premier cas, la tique transmet la maladie à sa descendance. La transmission est dite aussi "verticale". Dans le second, rarement observé, le passage de l'agent infectieux se fait du mâle vers la femelle lors de l'accouplement (**Plowright 1970b ; Plowright 1974 ; Kleiboeker 1998**).

Une seule expérience témoigne le passage de virus d'un suidé sauvage (potamochère) contaminé à un porc sain (**Anderson et al, 1998**). Des essais expérimentaux ont démontré que la diffusion aérienne du virus en milieu ouvert est peu probable (**Plowright, 1981**). Cette voie

d'infection ne semblerait possible que dans certains endroits où la consommation de gibier est fréquente et où les porcs domestiques sont nourris avec des eaux grasses ou des abats de gibier infecté.

A Madagascar, la plupart des fermes sont de petites d'exploitations où presque aucune mesure sanitaire n'était jusqu'alors appliquée. La transmission du virus est en général directe d'un porc malade vers un porc sain ou indirecte par du matériel souillé. Beaucoup d'opportunités de contacts existent avec des porcs infectés ou du matériel souillé: la divagation des porcs parfois très forte dans certaines régions de production, contact lors des échanges commerciaux ou pendant la saillie, contact avec des animaux d'autres espèces présents sur les lieux et se déplaçant d'un élevage à un autre (poules, chiens, rats, etc..) et agissant comme des vecteurs mécaniques d'introduction de la maladie dans les élevages (**Costard et al, 2009**). La transmission du virus aux porcs malgaches via une tique molle ornithodore a été suggérée mais reste à être démontrée.

Cycle de la transmission du virus de la PPA

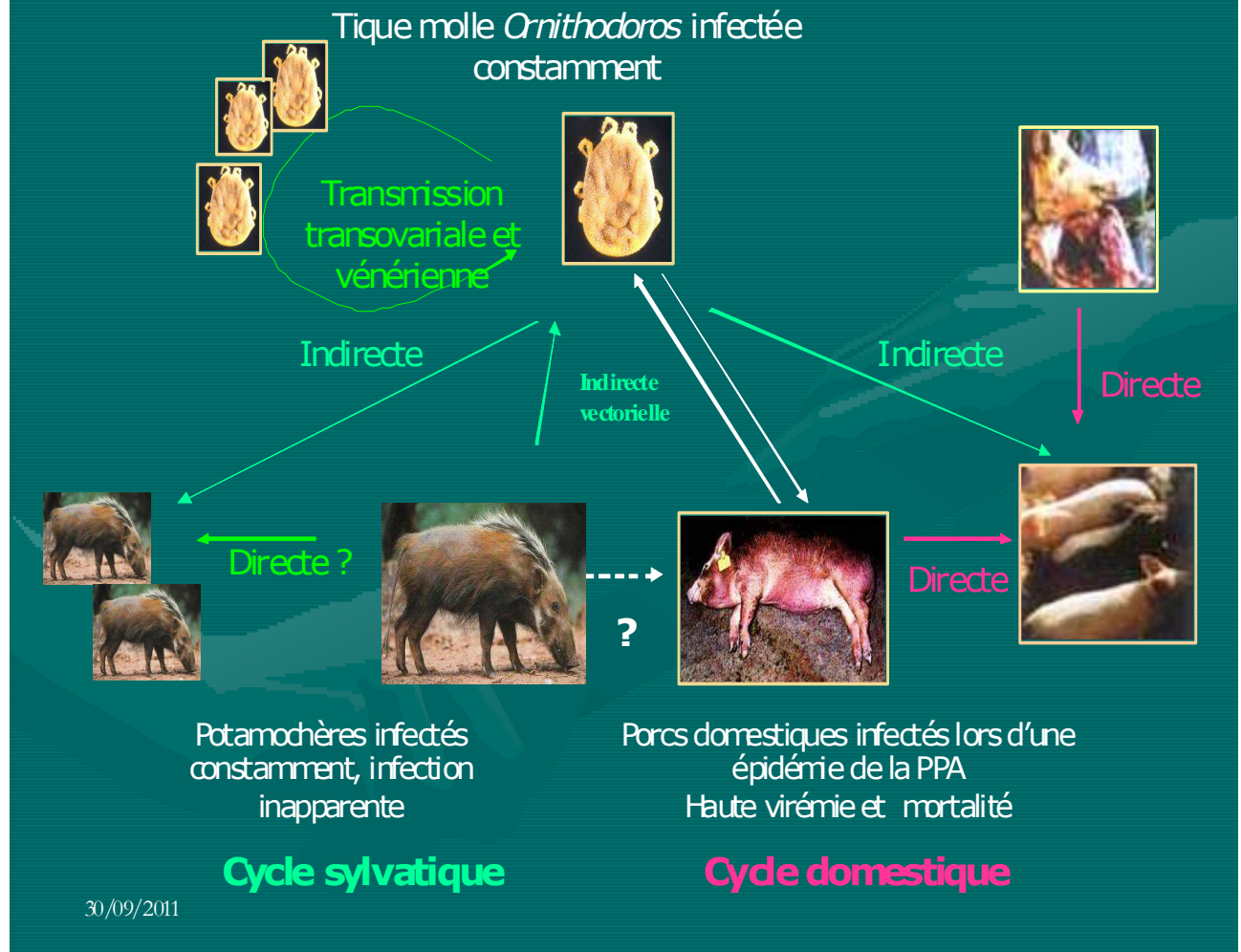


Figure 4 : Cycle de transmission du virus de la PPA chez les différents hôtes (le porc domestique, la tique molle et le potamochère)

1.4.2. Réplication et pathogénie

Plusieurs études sur l'infection aiguë de porcs par le virus de la PPA ont montré que la principale voie de pénétration virale est classiquement la muqueuse pharyngienne et les amygdales. Le virus passe ensuite dans les nœuds lymphatiques rétro-pharyngiens à partir desquels il se dissémine rapidement dans le sang. L'infection généralisée apparaît environ 30 à 48h après l'exposition au virus (**Colgrove et al, 1969**) et 24 à 48h avant les premiers signes cliniques dus à la virémie. Dans les formes aiguës de maladie, la concentration de virus dans le sang peut atteindre 10^8 HAD₅₀/ml et ceci 72h après l'introduction du virus.

La multiplication secondaire du virus se fait dans tout l'organisme, en particulier dans la rate, le foie, les nœuds lymphatiques, la moelle osseuse et le poumon. A ce stade de l'infection, les souches virales modérément et hautement pathogènes se multiplient principalement dans les monocytes et les macrophages du système phagocytaire mononucléaire qui sont les cibles principales pour la réplication virale *in vivo* (**Malmquist et Hay, 1960 ; Colgrove et al, 1969 ; Fernandez et al, 1992 a, b ; Oura et al, 1998b**).

La réplication du virus a été aussi observée dans les cellules endothéliales (**Wilkinson et Wardley, 1978**) ; (**Gomez-Villamandos et al. 1995 a, b, c,**), les hépatocytes (**Gomez-Villamandos et al, 1995d**), les cellules épithéliales des tubules rénaux (**Gomez-Villamandos et al, 1995**), les granulocytes neutrophiles (**Carrasco et al, 1996**), les cellules mégacaryocytaires (**Colgrove et al, 1969, Edwards et al, 1985b**), les cellules épithéliales du thymus (**Pan I, 1987**), les cellules fibroblastiques et les cellules musculaires lisses des veinules et des artérioles (**Gomez-Villamandos et al, 1995a**).

Le virus provoque une grave lymphopénie (**De Tray et al, 1957**) par apoptose des lymphocytes alors qu'ils ne sont pas affectés par le virus. Il a été démontré récemment que la production des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages infectés est fortement dirigée pour induire l'apoptose sur des populations de lymphocytes (**Oura et al, 1998 ; Salguero et al, 2002, 2005**).

La pathogénie du virus de la PPA est expliquée, dans les stades précoces de l'infection, par la destruction massive des monocytes et des macrophages qui libèrent des produits actifs perturbant l'hémostase (**Plowright et al, 1994**). En outre, le virus peut s'attacher sur les érythrocytes et les plaquettes sanguines (phénomène d'hémadsorption), provoquant des thromboses dans les vaisseaux sanguins périphériques et des hémorragies associées (**Plowright et al, 1994**). Enfin, la destruction des cellules du système réticulo-endothélial contribue à diminuer la phagocytose des facteurs de la coagulation, donnant naissance à une

coagulation intra vasculaire disséminée. La destruction des cellules endothéliales avec la prolifération de lysozymes et de débris de cellules phagocytaires provoque une nécrose de la membrane capillaire à laquelle les plaquettes se sont fixées (**Gomez-Villamandos et al, 1995b**). Elle donne naissance ainsi à des hémorragies.

L'œdème alvéolaire noté dans les stades finaux de la maladie est la conséquence de l'activation des macrophages intra-vasculaires pulmonaires. Le virus est excrété principalement au niveau de l'appareil respiratoire supérieur 1 à 2 jours avant l'apparition de la fièvre et persiste jusqu'à la mort de l'animal.

Contrairement aux porcs domestiques, les suidés sauvages réservoirs hébergent une quantité très faible de virus dans leurs tissus. Le système lymphatique semble être privilégié. Seuls les jeunes, qui s'infectent peu de temps après la naissance, présentent une virémie susceptible de permettre la transmission du virus à une tique fixée, par piqûre mais jamais par contact direct à un autre suidé.

Chez la tique, le virus se réplique tout d'abord au niveau de l'épithélium de l'estomac moyen. Après 15 à 21 jours, l'infection se généralise. Le virus gagne les glandes salivaires et les glandes coxales, dont les sécrétions sont contaminantes. Les tiques sont infectieuses pendant une période allant jusqu'à 8 ans, peuvent rester sans se nourrir à l'état quiescent pendant près de 5 ans (**Fernandez Garcia, 1970; Oleaga-Perez, 1990; Boinas, 1995**). Elles peuvent vivre jusqu'à plus de quinze ans (**Encinas et al, 1999**).

1.5. Signes cliniques de la PPA

La PPA est généralement considérée comme une maladie entraînant la mort de 100% des porcs domestiques atteints mais il existe différentes formes : aiguës, suraiguës voire chroniques (**Moulton et al, 1968**). En général, dans la forme aiguë, les porcs infectés meurent très rapidement. Quelques animaux peuvent cependant parfois survivre à de telles épizooties. Après infection, ils ne présentent pas de lésions mais de faibles symptômes non mortels, et peuvent présenter une virémie pendant plusieurs semaines (**Mebus et al, 1979**), ainsi que des anticorps détectables dans leurs sérums. Ce sont ces porteurs chroniques qui peuvent infecter un porc sensible. De même, certains porcs sembleraient pouvoir guérir totalement de leur infection mais continueraient à héberger du virus après 110 jours à 135 jours et à pouvoir infecter d'autres porcs (**Mebus, 1980**).

A Madagascar, durant la première épizootie de PPA en 1997, le virus était très virulent et les porcs, très sensibles à cette maladie : le taux de mortalité des porcs pouvait atteindre jusqu'à

100% (Rousset et al, 2001). Par la suite, la maladie est devenue endémique. Selon des enquêtes menées auprès des éleveurs par la MPE (MPE, 2005), des foyers réguliers de PPA semblent exister et une diminution de la sensibilité des animaux au virus est rapportée en relation avec une baisse progressive du taux de mortalité.

La figure 5 montre les différentes formes de l'infection par la PPA chez les porcs (Source CIRAD, 2004).

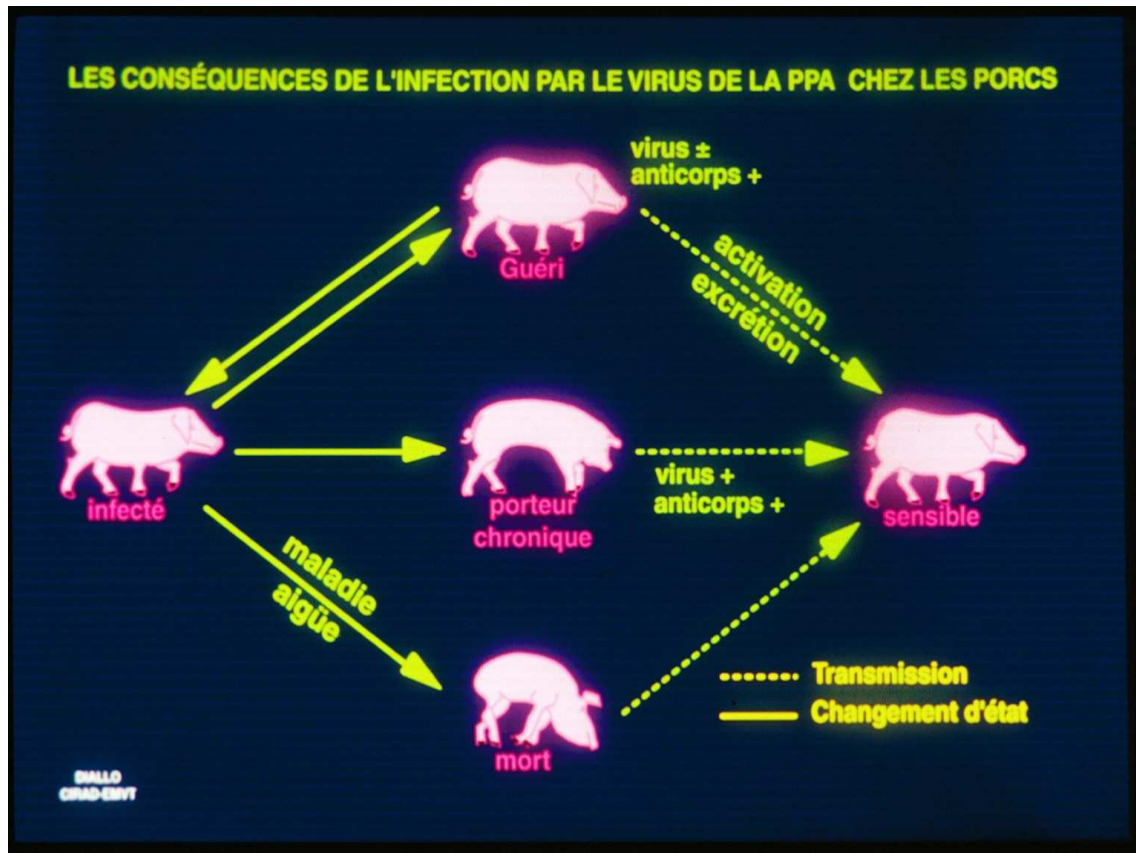


Figure 5 : Les conséquences de l'infection du virus de la PPA chez les porcs
(Source : CIRAD, EMVT)

Les signes cliniques observés chez les porcs atteints de PPA sont variables selon l'étape de la maladie, la virulence des souches et la sensibilité de l'hôte. Différentes formes de la maladie ont été décrites selon ces critères :

- La forme suraiguë : Elle est caractérisée par l'apparition brutale d'une fièvre importante (température supérieure à 41°C) associée à un état hémorragique. La mort survient généralement en 1 à 3 jours sans autres symptômes ni lésions apparentes.

- La forme aiguë : Après une période d'incubation variant de 5 à 15 jours, elle se caractérise par une forte fièvre (41-42°C), une anorexie et une apathie. Un à deux jours plus tard, apparaissent divers symptômes isolés ou associés : conjonctivite, symptômes respiratoires (dyspnée, toux, jetage), symptômes digestifs (constipation fréquente suivie de diarrhée et vomissements sanguinolents), symptômes cutanés (cyanose, congestion dans les zones à peau fine), symptômes nerveux (ataxie, paralysie du train postérieur, etc....). En fin d'évolution (24-48 heures avant la mort), l'animal est anorexique et nonchalant ; il présente une cyanose et une incoordination des mouvements. Chez la truie en gestation, l'avortement peut se produire. La mort survient 6 à 20 jours après l'apparition des symptômes. Elle peut parfois toucher 100% de l'effectif.
- La forme subaiguë : Elle est causée par un virus modérément virulent. L'incubation varie de 3 à 4 semaines, puis apparaissent des symptômes identiques que ceux de la forme aiguë, mais de façon atténuée. Ces symptômes présentent cependant une grande variabilité entre porcs. La maladie dure de 30 à 45 jours. La mortalité est de 30% à 70% mais elle est surtout élevée chez les jeunes animaux.
- La forme chronique : Elle se caractérise par divers signes cliniques tels que l'amaigrissement progressif, des difficultés respiratoires, de l'arthrite, des ulcères cutanés et des avortements. Le taux de mortalité est plus faible allant de 2% à 10%. Les animaux sont vulnérables aux infections secondaires et à la pneumonie. La maladie se développe dans un intervalle de 2-5 mois. Les porcs ayant survécu à une forme subaiguë peuvent développer la forme chronique.
- Les formes atypiques : Ces formes s'expriment sous des aspects très variés tels que des troubles de la reproduction (avortements, mortinatalité, malformations congénitales), des retards de croissance, des poussées thermiques et quelques cas de mortalité. Une truie infectée pendant la gestation peut mettre bas des porcelets Infectés Permanents Immunotolérants (ou IPI).
- La forme inapparente : Elle s'observe notamment chez les suidés sauvages d'Afrique qui s'infectent, hébergent le virus toute leur vie et constituent ainsi un réservoir sauvage de virus sans jamais présenter de symptômes. Elle est également rencontrée chez les IPI. Lors de circonstances favorisant telles que le stress, notamment lors de leur transport par les collecteurs ou chasseurs vers les marchés, la maladie peut se déclarer chez ces individus.

1.6. Lésions provoquées par la PPA

Les lésions observées lors de PPA sont inconstantes et non spécifiques. Toutefois, il est possible de distinguer certaines lésions qui sont fréquentes.

- Pour les formes suraiguës (**Plowright et al, 1994; Penrith et al, 2004**) : les porcs meurent sans que des signes cliniques se soient développés. Cependant, ils présentent une congestion généralisée des organes avec une exsudation de liquide inflammatoire dans les cavités abdominale et pulmonaire.

- Pour les formes aiguës (**Gomez-Villamandos et al, 1996 ; Sanchez-Botija 1982 ; Plowright et al, 1994; Penrith et al, 2004**): les lésions hémorragiques dominent et atteignant divers organes et tissus. La peau présente un piqueté hémorragique pouvant aller jusqu'à la nécrose. La présence d'ecchymoses cutanées sur les jambes et l'abdomen peut être notée. Les nœuds lymphatiques et les amygdales sont hypertrophiés, avec des marbrures hémorragiques dans la zone corticale, ou sont parfois totalement hémorragiques. Les lésions les plus fréquentes se rencontrent sur les nœuds lymphatiques rénaux, gastro-hépatiques et mésentériques (Figure 6). Les reins présentent un piqueté hémorragique en "œuf de dinde" (Figure 7) et la rate hypertrophiée présente des hématomes (Figure 8). La vessie montre un piqueté hémorragique. Des pétéchies sont observées sur le larynx, l'épiglotte, le cœur ainsi que la plèvre et le péritoine. L'appareil gastro-intestinal semble être normal mais les hémorragies sont habituellement présentes dans le mucus gastrique (Figure 9). Le contenu des intestins est généralement limité, fluide et parfois sanguinolent. Les poumons sont également hémorragiques et montrent une exsudation et une mousse. La trachée est habituellement remplie de mousse et peut être tachetée de sang.

- Pour les formes subaiguës ou chroniques : la peau présente parfois des abcès multiples et œdémateux, localisés sur le groin, le cou, les trayons. Ils peuvent progresser en lésions nécrotiques et purulentes. Les lésions internes sont plutôt de type ulcéreux et sont observées sur le tube digestif, en particulier au niveau du cæcum et du côlon. Les ulcères sont plats, non perforants sauf lors de surinfection bactérienne. Une consolidation des lobes pulmonaires ainsi qu'une péricardite fibrineuse peuvent également être observées dans ces formes de la maladie. Les principales lésions histologiques observées sont une dégénérescence des cellules endothéliales (à l'origine des lésions hémorragiques) et une leucopénie.

Pour les formes inapparentes : Les suidés sauvages d'Afrique (les phacochères et les potamochères) sont résistants en général à l'infection et ne présentent aucune lésion (**Oura et al, 1998**).



Figure 6 : Hémorragie et congestion des ganglions mésentériques



Figure 7 : Rein hémorragique



Figure 8 : Hypertrophie de la rate

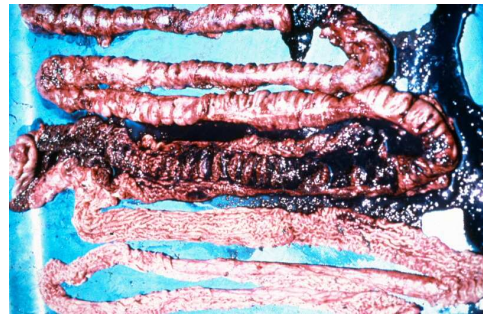


Figure 9 : Hémorragies de l'intestin

1.7. Réponse immunitaire et protection chez le porc

Les porcs survivant à une infection par le virus de la PPA développent une réponse immunitaire protectrice, très spécifique du virus en cause (réponse homologue) mais ils ne résistent pas à une infection par une souche hétérologue (**Wardley et Wilkinson, 1985**). Des études antérieures ont démontré que l'infection par le virus de la PPA n'entraînait pas de production d'anticorps sériques neutralisants globaux (**De Boer et al, 1969, Ruiz-Gonzalvo et al, 1986**).

L'étude des mécanismes de neutralisation ainsi que de leurs principaux déterminants antigéniques a montré que des anticorps dirigés contre les protéines p70/72 et p54 étaient impliqués tout au début du cycle de réplication du virus, c'est-à-dire lors de la phase d'attachement, tandis que des anticorps reconnaissant la protéine p30/32 étaient associés à l'inhibition de l'internalisation du virus (**Gómez-Puertas et al, 1996**). L'immunisation de porcs par un mélange de protéines p30/32 et p54 permet à la fois la neutralisation du virus et

une modification de la clinique de la maladie (symptômes retardés) (**Gómez-Puertas et al, 1998**). Néanmoins, de récents travaux suggèrent que les anticorps neutralisants reconnaissant les protéines p70/72, p54 et p30/32 du virus de la PPA ne seraient pas suffisants pour permettre une protection efficace (**Neilan et al, 2004**). Le virus induit *in vivo* des anticorps mais il ne semble pas entraîner la formation d'anticorps neutralisants. Ceci explique l'échec des tentatives de développement d'un vaccin efficace et ce malgré 30 années de recherche dans ce domaine.

1.8. Diagnostic de la PPA

Le diagnostic définitif impose le recours aux méthodes de laboratoire car il est impossible de distinguer la PPA de la PPC par la symptomatologie (**Mc Daniel et al, 1986**). Une confusion avec des septicémies d'origine bactérienne ou des maladies des suidés à expression cutanée comme le rouget, la maladie de Teschen, la salmonellose ou la pasteurellose est également possible (**Sanchez –Vizcaino 1999**).

Dans les pays indemnes où la PPA a été introduite récemment ainsi que dans les cas d'épizootie, il est important d'isoler et d'identifier la souche virale en cause en réalisant un diagnostic virologique, par exemple par amplification génomique de l'ADN du virus. A l'inverse, dans les régions d'enzootie où le virus a été déjà identifié et circule régulièrement, la méthode de diagnostic la plus efficace est la recherche d'anticorps spécifique par l'intermédiaire du diagnostic sérologique en vue de connaître l'évolution de la séroprévalence vis-à-vis de la maladie.

1.8.1. Diagnostic sérologique

Les immunoglobulines IgM peuvent être détectées au bout de 4 jours d'infection par le virus de la PPA, tandis que les IgG apparaissent après 6 à 8 jours d'infection (**Sanchez –Vizcaino 1999**). De nombreuses techniques ont été développées pour la détection d'anticorps contre le virus de la PPA. Parmi les plus utilisées :

- l'immunofluorescence indirecte (IFI) (**Bool et al, 1969 ; Sanchez Botija et al, 1970**), qui a une spécificité et une sensibilité élevées. Le test est basé sur la détection d'anticorps spécifiques se liant à l'antigène du virus contenu dans les cellules infectées en culture cellulaire. La technique implique la formation d'un complexe antigène-anticorps marqué avec l'anticorps anti-immunoglobuline conjugué à la fluorescéine. Cette réaction est ensuite visionnée sous ultra-violet (Figure 10) à l'aide d'un microscope à fluorescence.

1.8.2. Diagnostic virologique

Les prélèvements de choix à effectuer pour ce type de diagnostic sont le sang recueilli sur anticoagulants (héparine ou EDTA), la rate, les reins ou les nœuds lymphatiques prélevés sur des animaux morts récemment. Ces prélèvements doivent être conservés et acheminés au laboratoire à 4°C (Voir Annexe 13).

Le virus de la PPA se multiplie seulement dans des cultures de moelle osseuse ou de leucocytes (macrophages, monocytes) de porc. Il peut être révélé dans ces cultures cellulaires par son effet cytopathique (EC), sa propriété d'hémadsorption (s'il s'agit de souche hémadsorbante) (**Malmquist and Hay 1960**), par la méthode d'immunofluorescence directe (IFD) (**Bool et al, 1969**), et par l'amplification génique ou Réaction de Polymérisation en Chaîne, PCR (Polymerase Chain Reaction) (**Wilkinson, 1996 ; Agüero, 2003**).

a) Les tests d'hémadsorption (HA) ou l'effet cytopathique (EC) sont des techniques universelles de détection virale. Ils présentent une grande sensibilité et spécificité. Le test HA est basé sur la détection de rosettes se formant autour des macrophages infectés lorsqu'ils s'agrègent aux érythrocytes. L'EC apparaît pour certaines souches ne produisant pas d'HA.

b) La technique d'IFD consiste à détecter certains antigènes du virus à partir d'un calque de tissu ou d'organe sur lame en présence du conjugué d'immunoglobuline. La réaction est visualisée sous microscope à ultra-violet. Le test est rapide et il est peu coûteux. Il possède une haute sensibilité et est utilisé surtout en cas de maladie aiguë. Dans une forme subaiguë ou chronique, sa sensibilité diminue à 40%. L'utilisation simultanée des deux tests d'immunofluorescence (IFI et IFD) permet de détecter la présence de virus dans 90% des cas (**Sanchez-Vizcaino, 1986**).

c) La détection du virus de la PPA par PCR a été développée en utilisant un couple d'amorces permettant d'amplifier une région conservée de l'ADN viral. Cette technique permet de détecter du virus quel que soit son génotype et ce même s'il s'agit d'une souche faiblement virulente qui a perdu le pouvoir d'hémadsorption (**Wilkinson, 1996**). Ce test est également utilisé pour analyser des échantillons mal conservés où l'isolement du virus serait impossible. Il s'agit d'un test très rapide, de haute spécificité et sensibilité mais coûteux en termes d'équipement.

La souche malgache, considérée comme non hémadsorbante et non cytopathique, a été identifiée par amplification génique de son ADN (**Gonzague et al, 2001**).

1.9. Prophylaxie et prévention de la PPA

Etant donné qu'il n'existe aucun traitement ni vaccin pour lutter contre la PPA, le contrôle de cette maladie ne peut se faire qu'à l'aide de mesures prophylactiques sanitaires draconiennes (**Arias et Sanchez-Vizcaino, 2002**). A cette fin, diverses actions doivent être prises selon la situation épidémiologique de la région ou du pays (**OIE, 2006**), (**OIE, 2004**) :

a) En pays indemne, la prophylaxie repose sur une politique d'importation stricte concernant les pays infectés : interdiction absolue d'importation de porcs vivants ou de tout produit dérivé de porcs. La prophylaxie repose aussi sur l'élimination des déchets alimentaires issus des avions ou des navires en provenance des pays infectés. Cette prophylaxie est appelée prophylaxie défensive.

Durant un foyer, par introduction du virus dans le pays indemne, les mesures prises reposent sur le dépistage et l'abattage rapide des porcs malades, l'élimination correcte des cadavres et des litières, le nettoyage soigneux et la désinfection complète des locaux, l'identification de la zone infectée, le contrôle des déplacements de porcs et la réalisation d'études épidémiologiques approfondies en amont et en aval pour comprendre la survenue du foyer et sur la mise en place de la surveillance de la zone infectée et de la région environnante. Ces actions constituent la prophylaxie offensive.

b) Dans les pays infectés, où la maladie circule sous forme enzootique, une lutte contre la divagation des porcs et une politique d'isolement sanitaire des élevages permettent de réduire l'incidence de la maladie et d'envisager à plus long terme son éradication. Dans les pays où des tiques molles vecteurs du virus existent, l'utilisation régulière d'acaricides dans les porcheries est recommandée. Le contrôle de la maladie repose aussi sur un diagnostic rapide et fiable de laboratoire pour pouvoir maîtriser rapidement la maladie.

Comme pour les pays indemnes, la propagation du virus lors de foyers est réduite par l'euthanasie des animaux malades, l'incinération des carcasses, la désinfection et le vide sanitaire des porcheries, la mise en quarantaine des animaux indemnes.

Dans les pays en voie de développement, le manque de moyens financiers et l'absence de contrôle des mouvements d'animaux rendent ces mesures difficilement applicables.

A Madagascar, dès la découverte officielle de la maladie, des mesures gouvernementales ont été prises pour limiter son extension dans les zones encore indemnes : mesures sanitaires à

prendre en cas de maladie contagieuse (Arrêté interministériel du 11 février 1998), lutte contre la divagation des porcs (Arrêté interministériel du 8 mars 2000). Un réseau de vigilance épidémiologique a été mis en place. Des campagnes d'information et de sensibilisation ont été réalisées par la direction des services vétérinaires (**Roger, communication personnelle, 1999**). Néanmoins, ces mesures n'ont pas été suffisantes car l'abattage systématique de tous les porcs qui étaient en contact avec les malades n'a pas été réalisé à cause de manque de financement pour indemniser les éleveurs concernés. La maladie s'est propagée dans presque toute l'île, décimant plus de 50 % du cheptel porcin, et induisant une désorganisation importante de la filière. Les élevages modernes, les animaux de bonne valeur génétique, ainsi que de nombreuses provenderies industrielles ont disparu (**MPE, 2004**).

1.10. Répartition géographique et épidémiologie de la PPA

Découvert initialement au Kenya en 1921 par Montgomery (Figure 11), le virus de la PPA a ensuite été mis en évidence dans la majorité des pays d'Afrique australe et d'Afrique de l'Est (Figure 11), considérés comme le berceau de la PPA, excepté le Rwanda, le Burundi, l'Ouganda, le Botswana, la Namibie et les pays du nord-est. La maladie est clairement enzootique au Kenya, en Zambie, au Malawi, en Angola, en Afrique du Sud et au Mozambique. En Afrique du Sud, l'émergence de la PPA en 1951 puis en 1973 après des périodes inter-épizootiques de 12 et 10 ans, respectivement, suggère fortement l'existence d'un cycle sauvage de transmission du virus permettant son maintien entre les périodes d'épizootie (**Pini, 1975**). Au contraire, en Angola, il est supposé que la persistance du virus serait plutôt due à une perte de virulence chez ce dernier du fait de son importante circulation entre porcs domestiques, entraînant ainsi son établissement à long terme au sein des cheptels porcins (**Plowright 1981, Vehlo 1956**).

La situation épidémiologique de la PPA en Afrique Centrale est moins claire puisque la maladie n'a été rapportée qu'en République Démocratique du Congo (ex-Zaïre) et en République du Congo. Aucun cas n'a été déclaré depuis 2005 (Figure 12) en République centrafricaine et au Gabon tandis que des foyers y avaient été précédemment observés.

En Afrique de l'Ouest, la PPA s'est rapidement diffusée dans de nombreux pays à partir de l'Afrique de l'est. La Guinée-Bissau, le Sénégal, le Cap Vert, le Cameroun et probablement la Gambie et le Nigéria ont été infectés à partir de la fin des années 1950 jusqu'au début des

années 1980 (Figure 11). Dans ces pays, la PPA a diffusé dans la majorité des élevages porcins et y est devenue enzootique (FAO, 1998). Pour l'instant, les facteurs responsables de l'endémisation de la maladie dans cette région ne sont pas connus. L'existence d'un cycle sauvage semble peu probable et les experts sont plutôt en faveur d'un manque de suivi dans les mesures sanitaires de contrôle empêchant l'éradication de la maladie (FAO, 1998). En outre, des introductions sporadiques et uniques ont été rapportées au Soudan, au Tchad, et à Sao Tomé à la fin des années 1970 et 1980 (Sanchez-Botija, 1982). Enfin, une nouvelle période d'émergence a eu lieu en Afrique de l'Ouest dans les années 1990 et 2000 en Côte d'Ivoire, Bénin, Togo, Ghana et Burkina Faso (FAO 1997, 1998, 2000 ; OIE 2005). La PPA n'avait jamais été observée auparavant dans ces pays. Une récente étude génétique a prouvé que les isolats responsables de ces foyers étaient apparentés à ceux collectés dans les années 1950 lors de la première vague de PPA en Afrique de l'Ouest (Bastos et al 2003), suggérant qu'un foyer enzootique aurait bien été maintenu dans la région pendant au moins 10 ans.

La PPA a été introduite en Europe à partir des années 1950 et jusqu'à la fin des années 1970 (Figure 11). Elle est apparue tout d'abord au Portugal en 1957 (Figure 11) avec une mortalité atteignant 100% des animaux infectés. La maladie est réapparue dans ce même pays en 1960 et a touché aussi l'Espagne (Figure 11) (Sanchez-Botija, 1982) pour y persister jusqu'en 1993 et 1995, respectivement. Diverses études menées à cette époque ont confirmé la présence d'une tique molle ornithodore, *Ornithodoros erraticus*, dans les élevages porcins, responsable *à priori* du maintien du virus de manière endémique (Perez-Sanchez et al, 1994). Un nouveau foyer a été observé en 1999 au Portugal (OIE, 2000) mais il s'agissait d'un foyer isolé rapidement maîtrisé. Les deux pays sont désormais déclarés indemnes de PPA depuis les années 2000.

Lors de sa première introduction sur la péninsule ibérique, la maladie a diffusé de l'Espagne en France en 1964, à Madère en 1965, 1974 et 1976, en Italie en 1967, 1969 et 1993 (Manelli et al, 1998), à Malte et en Sardaigne en 1978, en Belgique en 1985, et aux Pays-Bas en 1986 (Figure 11). Tous ces pays d'Europe sont parvenus à éradiquer la maladie, hormis la région de la Sardaigne en Italie (Arias et Sanchez-Vizcaino, 2002a).

De l'Europe, la PPA a été introduite dans les îles Caraïbes et en Amérique du Sud créant des épidémies à Cuba en 1971 et 1980, en République Dominicaine en 1978, à Haïti en 1979 et au Brésil en 1978 (Figure 11). Elle a été éradiquée du continent Américain et des Caraïbes.

Plus récemment, la PPA a été introduite à Madagascar en 1997 (Figure 11) à partir de la côte est-africaine (**Gonzague et al, 2001**). La première épizootie de PPA est apparue mi-1997 dans la région de Taolagnaro (Fort-Dauphin) au sud-ouest du pays. Elle s'est ensuite propagée très rapidement vers d'autres régions, notamment vers les Hauts Plateaux, entraînant une forte mortalité porcine allant jusqu'à 90% (**Rousset et al, 2001**). Le diagnostic de la maladie a été confirmé en décembre 1998, à partir d'échantillons envoyés par le CIRAD au laboratoire CNEVA à Maisons-Alfort (France) (**Roger, communication personnelle, 1999**). Outre cette confirmation, l'analyse phylogénétique de la souche malgache a permis de montrer que la PPA aurait été vraisemblablement introduite à Madagascar à partir de la côte Sud Est de l'Afrique, du Mozambique (**Bastos et al, 2003**). La PPA s'est ensuite étendue dans tout le pays et y est devenue enzootique. Bien que les causes de cette endémisation ne soient pas complètement connues, la propagation de la maladie repose très certainement sur le manque de moyens pour permettre un diagnostic et un contrôle efficaces à Madagascar. La PPA se caractérise actuellement par l'apparition régulière mais sporadique de foyers dans de nouveaux élevages ou dans des élevages ayant déjà été infectés mais avec un taux de mortalité plus faible (**Costard, données non publiées**).

En 2007, la maladie a touché une nouvelle île de l'Océan Indien, la République de Maurice (Figure 12), provoquant ainsi une épidémie importante (**Lubisi et al, 2009**). Enfin, entre avril 2007 et août 2008 de nouveaux foyers de PPA ont été détectés en Géorgie, Arménie, Azerbaïdjan et Russie (**OIE, 2007, 2008**). La maladie semble s'y maintenir depuis cette date malgré les mesures d'abattage massif pris dans ces pays.

La figure 11 montre la répartition géographique de la PPA dans le temps.

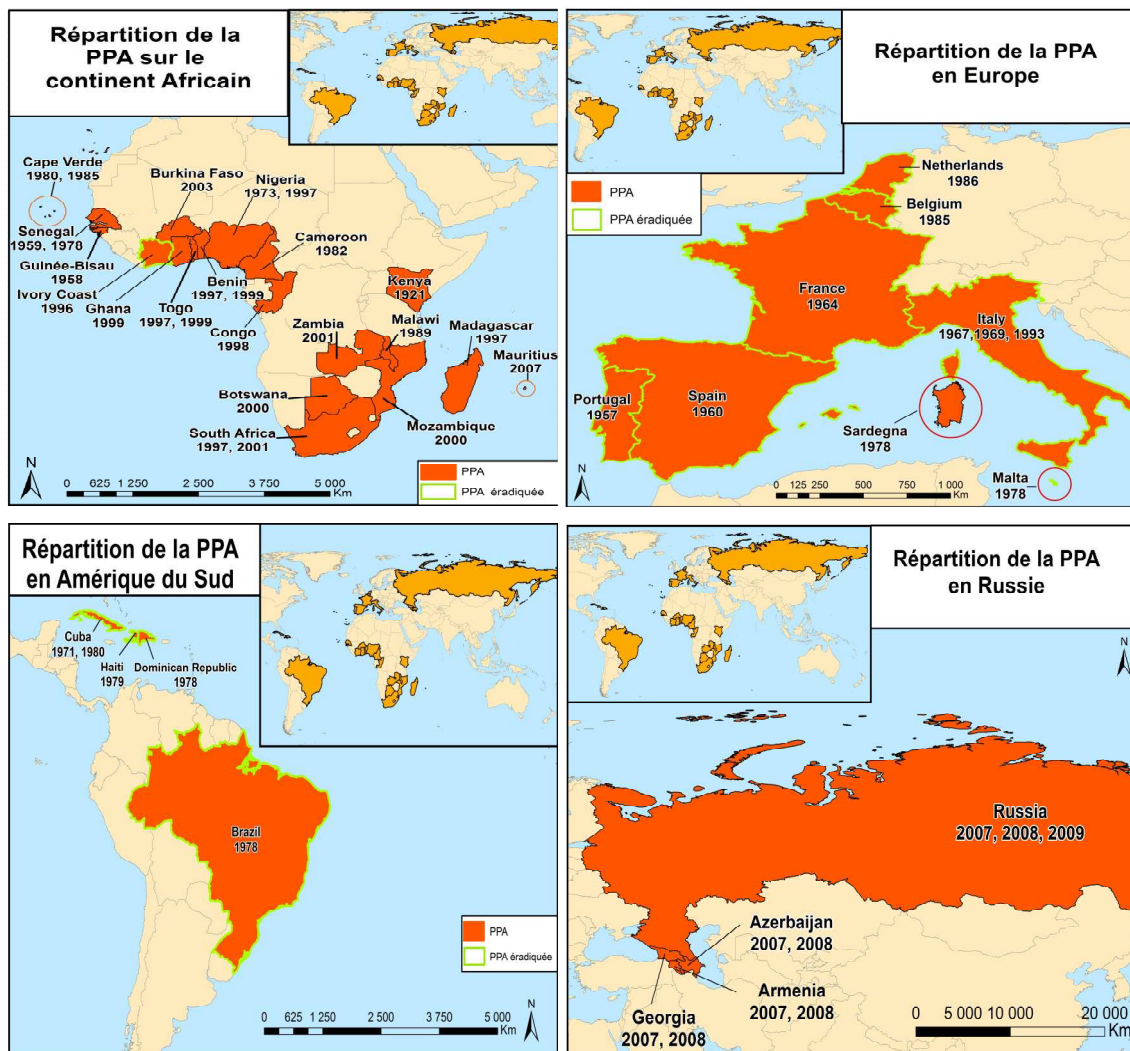


Figure 11 : Distribution géographique de la PPA

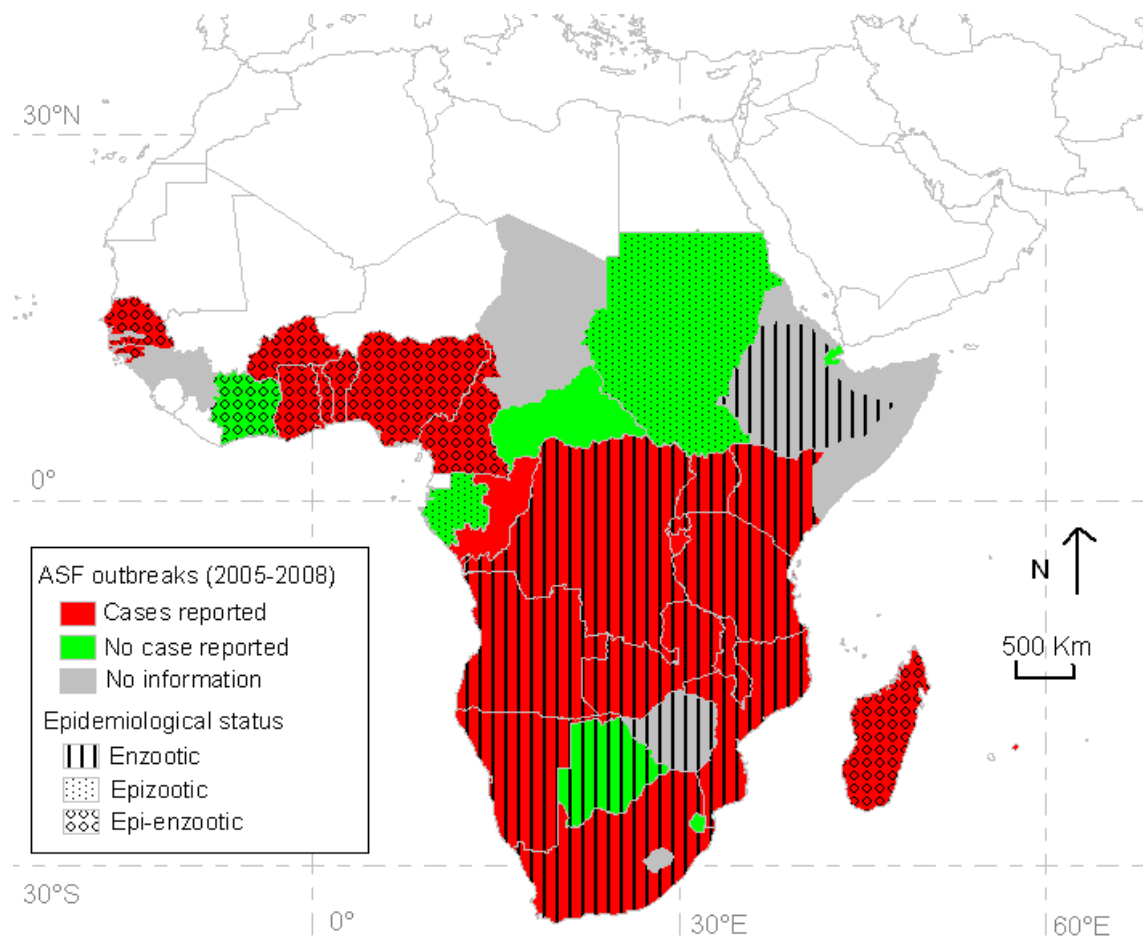


Figure 12 : Situation et statut épidémiologique de la PPA dans les pays africains pendant les 4 dernières années (2005 - 2008)
 (Source CFP/EFSA/AHAW/2007/02 Scientific review on African swine fever)

Chapitre 2 : Les réservoirs naturels et les vecteurs biologiques du virus de la PPA

1. Les suidés sauvages

La PPA affecte tous les membres de la famille des *Suidae*. Certains suidés sauvages africains sont, ainsi que cela a été indiqué précédemment, considérés comme les hôtes vertébrés naturels du virus de la PPA : ils peuvent être infectés sans exprimer un symptôme (**Oura et al, 1998 ; Anderson et al, 1998 ; Thomson, 1980**). Dès la première description du virus de la PPA au Kenya en 1921 (**Montgomery, 1921**), Montgomery suspectait que ce virus provenait des suidés sauvages, entre autres les phacochères (*Phacochoerus aethiopicus*), qui auraient propagé le virus chez les porcs domestiques. Par la suite, le cycle sauvage de la maladie impliquant des suidés sauvages tels que les phacochères (*Phacochoerus spp*) ou les potamochères (*Potamochoerus spp*), a été démontré dans de nombreux autres pays africains (**Thomson, 1985; Wilkinson, 1988; Plowright et al, 1994 ; Anderson et al, 1998**). Le virus a également été isolé une fois chez l'hylochère (*Hylochoerus meinertzhageni*) mais ce portage n'a pas été redémontré depuis (**Heuschele et Coggins, 1965**). Il est à remarquer que l'aire de répartition du phacochère et du potamochère en Afrique correspond globalement à celle de la PPA. En Europe, lors des épizooties de PPA en Espagne, au Portugal et en Sardaigne, des porcs sauvages ou sangliers (*Sus scrofa ferus*) ont été retrouvés tués par l'infection (**Sanchez-Botija, 1982, Contini et al, 1983**).

Plusieurs espèces et sous-espèces de suidés sauvages existent et leur contribution à l'épidémiologie de la maladie diffère selon les espèces, leur localisation géographique, leurs contacts potentiels avec les porcs domestiques ou d'autres hôtes naturels du virus.

1.1. Les phacochères (*Phacochoerus sp*)

Les phacochères vivent au sud du Sahara dans les zones de prairies et dans les régions boisées ouvertes. Ils appartiennent à deux espèces : *Phacochoerus africanus* (Figure 13) et *Phacochoerus aethiopicus*. *P.africanus* se trouve dans la plupart des prairies et des savanes du continent africain alors que *P.aethiopicus* est confiné à une petite région du nord-est du Kenya, à l'ensemble de la Somalie et probablement au sud-est de l'Éthiopie. Les densités de population observées pour ces deux espèces varient de 1 à 35 individus par km². La majorité

des données sur l'écologie et l'habitat des phacochères a été collectée à partir de travaux de terrain effectués en Afrique orientale et australe (**Vercammen et Mason, 1993**). Les phacochères jouent probablement un rôle plus significatif que les autres suidés sauvages africains dans le cycle épidémiologique de la PPA (**Thomson, 1985 ; Wilkinson, 1988 ; Plowright et al, 1994**) du fait de leur distribution géographique plus large et des taux d'infection rapportés au sein des populations plus élevés (**Thomson, 1985**).



Figure 13 : Phacochère d'Afrique (*Phacochoerus africanus*)
(Source : Le Glaunec, 2006)

En Afrique orientale et australe, le cycle sauvage met en scène deux acteurs : les phacochères et les tiques molles du genre *Ornithodoros*. Dans ces régions, des études réalisées sur des phacochères et basées sur l'isolement du virus de la PPA des tissus lymphoïdes ou sur la détection de sa circulation par analyses sérologiques, ont montré des variations des taux de prévalence de l'infection au sein des populations ainsi que des disparités de l'âge du début d'infection selon la localisation géographique (même sur de courtes distances) (**Wilkinson, 1989**). En Tanzanie, la prévalence d'anticorps contre le virus de la PPA chez les phacochères du Parc National du Serengeti est de 100%, alors qu'elle est de 50% à Magadi (environ à 200km du Serengeti) (**Heuschele et Coggins 1969**). En Ouganda, une enquête dans le Parc National Queen Elisabeth a rapporté une séroprévalence de 58% chez les phacochères de 4 à 12 mois et une décroissance de cette prévalence avec l'âge des animaux (**Plowright, 1981**).

En Afrique du Sud, la séroprévalence de la PPA chez les phacochères s'élève à 90% mais peut décroître jusqu'à 4% dans des zones pourtant très proches (**Penrith et al, 2004**). Au Kenya, près de 100 % des phacochères étudiés ont été détectés séropositifs (**Heuschele et al, 1969 ; Plowright, 1968, 1981 ; Simpson et al, 1979 ; Thomson, 1985**).

Individuellement, le phacochère infecté n'exprime jamais de symptômes de la maladie malgré la réplication du virus dans l'animal (**Thomson, 1980**). Toutefois, une faible quantité de virus est observée dans les tissus, le système lymphatique et le sang (**Plowright, 1981**). En général, la quantité de particules virales dans le sang du phacochère dépasse rarement $10^2 \text{HAD}_{50}/\text{ml}$ et diminue progressivement. Après cette phase généralisée de l'infection, le virus se localise dans divers ganglions lymphatiques superficiels, où on note une concentration plus élevée allant jusqu'à $10^{6.6} \text{HAD}_{50}/\text{ml}$, et le phacochère reste infecté pendant toute sa vie (**Wilkinson, 1989**). Même faible, la virémie dure 2 ou 3 semaines et est suffisante pour infecter des tiques molles ornithodores colonisant les terriers de phacochères et les infestant. Une fois contaminées, ces tiques s'alimentent préférentiellement sur les phacochères nouveau-nés qui passent plus de temps dans le terrier : elles infectent ainsi la nouvelle génération (**Thomson, 1980**). Les anticorps maternels n'offrent aucune protection aux nouveau-nés contre l'infection. La possibilité de transmission horizontale ou verticale du virus chez les phacochères n'a jamais été démontrée et l'entretien du virus dans des populations de phacochères dépend donc à priori exclusivement des tiques molles ornithodores (**Thomson, 1980 ; Plowright, 1981**).

Concernant le rôle des phacochères dans la transmission du virus de la PPA aux porcs domestiques, la possibilité d'une transmission directe du virus n'a jamais pu être démontrée, même lors de contacts étroits (**Heuschele et al, 1969 ; Plowright et al, 1969**). Ceci peut s'expliquer par l'incapacité des phacochères à sécréter la quantité de virus nécessaire à la transmission par voie oro-nasale. La transmission aux porcs domestiques de virus circulant originellement au sein d'une population de phacochères repose donc principalement, voire exclusivement, sur les tiques molles ornithodores. Elle intervient lorsque les porcs et les phacochères partagent les mêmes habitats et avec des tiques infectées amenées par des phacochères. Enfin, l'hypothèse de l'infection des porcs domestiques par l'ingestion de tissus infectés de phacochère n'a jamais pu être démontrée (**Penrith et al, 2004**).

Contrairement à l'Afrique australe et orientale, l'existence d'un cycle sauvage faisant intervenir les tiques molles et les phacochères n'a pour l'instant jamais été démontrée en Afrique de l'ouest. Toutefois, au Sénégal, où la PPA est enzootique, de récentes études ont

montré que la tique molle *O. sonrai* pouvait coloniser les porcheries villageoises où elle a été trouvée naturellement infectée par le virus de la PPA (Vial et al, 2007). Des expériences de compétence vectorielle pourraient permettre de confirmer ou d'infirmer le rôle de cette tique comme réservoir naturel et vecteur de la maladie. Cependant, ces tiques ne semblent pas pouvoir coloniser les terriers de phacochères, trop secs et trop ouverts dans cette région d'Afrique (Vial et al, 2007) et entretiendraient donc seulement un cycle domestique de transmission parmi les porcs domestiques. Dans ces conditions, il est peu probable que le virus de la PPA circule dans les populations de phacochères d'Afrique de l'ouest (Taylor et al, 2007 ; Jori et al, 2007).

1.2. Les potamochères (*Potamochoerus sp*)

Le potamochère (*Potamochoerus*) est un artiodactyle de la sous-famille des *Suinae*. *Potamochoerus larvatus* et *Potamochoerus porcus* sont les deux représentants du genre *Potamochoerus* dans le monde. Ils ne sont rencontrés qu'en Afrique et à Madagascar. Ces deux espèces diffèrent par la couleur de leur pelage et leur distribution géographique. Le *Potamochoerus porcus* est aussi appelé sanglier rouge des rivières. Il a un pelage assez clair et possède une raie dorsale blanche bien distincte (Figure 14). Il se trouve seulement en Afrique de l'ouest et en Afrique centrale, du sud-ouest du Sénégal (région de Casamance) à l'est de la République Démocratique du Congo (Figure 15). Une diminution des populations de potamochères existe à l'ouest et à l'extrême nord, du fait de l'activité humaine (chasse en excès et destruction de l'habitat).

P. larvatus est de couleur marron, plus foncé que *P. porcus*, sans masque blanc et avec un museau plus long (Figure 16). Il s'étend au sud de la République Démocratique du Congo, à l'est de l'Afrique du sud et à Madagascar (Figure 17).

Très peu d'études ont été conduites sur ces deux espèces. La majeure partie des informations ont été acquises à partir des observations réalisées sur les *P. larvatus* d'Afrique du Sud (Seydack, 1990 ; Vercammen et al, 1993). Les deux espèces vivent en petits groupes familiaux comportant 4 à 10 individus. Toutefois dans certaines régions équatoriales, des groupes de plus de 30 individus ont été rapportés pour *P. porcus*, alors que *P. larvatus* forme de petits troupeaux. Les deux espèces sont sédentaires et territoriales (Vercammen et al, 1993) mais extrêmement grégaires. Un groupe est composé d'un mâle et d'une femelle dominants, puis d'autres adultes femelles et des jeunes. La taille moyenne du territoire occupé par un animal dépend essentiellement de la disponibilité des aliments et de la qualité de

l'habitat. La densité de potamochères dans plusieurs régions d'Afrique du sud se situe entre 0,35 et 0,5 animaux/km² et dépasse les 3 individus/km² dans certaines zones de forêt tropicale humide. Le cycle de reproduction du potamochère est saisonnier. Des facteurs tels que la disponibilité alimentaire, la photopériode ou la température pourraient intervenir dans le déclenchement des chaleurs. En Afrique australe, la majorité des naissances ont lieu au début de la saison des pluies (entre octobre et décembre). Comme chez d'autres espèces de suidés sauvages, la possibilité de 2 mises-bas par an existe dans les zones intertropicales bénéficiant de deux saisons de pluies. Au sein d'une unité familiale, seul le couple dominant monogame se reproduit, une fois la maturité sexuelle atteinte vers 20 mois de vie. Au terme d'une gestation de 110-120 jours (**Seydack, 1990, 1991**), soit environ 4 mois, la femelle très agressive donne naissance à 3 ou 4 petits en moyenne, bien que des portées de 6 à 8 animaux aient été décrites. La dispersion des jeunes se produit entre 1,5 et 2 ans d'âge. Essentiellement nocturnes, les potamochères passent souvent la journée à dormir dans leur bauge. Les potamochères vivent partout du moment qu'ils peuvent trouver une végétation abondante et de l'humidité. Ils sont rencontrés dans toutes les zones forestières d'aspect guinéen et dans les zones soudaniennes aux abords des fleuves où il leur arrive de cohabiter quelquefois avec des phacochères. Concernant la cohabitation potamochères-porcs domestiques, il a été plusieurs fois rapporté dans différentes régions d'Afrique (Burkina Faso, Gabon ou Zaïre) (**Simoons, 1953 ; Vercammen et al, 1993**) et à Madagascar que les potamochères avaient la capacité de s'hybrider avec les porcs domestiques (**Vercammen et al, 1993 ; Kingdon 2003**) (**Jori, communication personnelle**). Le porc domestique possède pourtant 34 paires de chromosomes et le potamochère 38 (**Malandier, 1980**). Étant donné la distance génétique entre ces deux organismes, il est peu probable que leurs hybrides soient fertiles. Cependant, plusieurs éléments laissent penser l'existence effective dans la nature d'hybrides issus du croisement de potamochères avec des porcs en divagation. Ces cas ont été signalés dans plusieurs pays d'Afrique comme le Burkina Faso, le Gabon et le Zaïre (**Simoons, 1953 ; Vercammen et al, 1993**).

Concernant l'épidémiologie de la PPA, le rôle des potamochères est moins important que celui des phacochères puisqu'ils sont moins nombreux que ces derniers. Ils ont une prévalence d'infection inférieure à celle des phacochères (**Wilkinson, 1988**). Certains auteurs estiment que le taux de prévalence de l'infection par le virus de la PPA chez les potamochères est dix fois moindre que celui observé chez les phacochères (**Mansvelt, 1963**). En outre, il a été suggéré que le virus de la PPA circulait seulement occasionnellement ou « à bas bruit » chez

les potamochères (Jori et al, 2007). Comme les phacochères, les potamochères infectés ne présentent aucun signe clinique et peu de lésions tissulaires (Anderson et al, 1998) (Haresnape et al. 1985; Jori et al. 2007; DeTray 2008). Dans le tissu lymphoïde, une faible apoptose et une dissémination « à bas bruit » du virus à d'autres tissus lymphoïdes sont observées (Oura et al, 1998). Cette dissémination est favorisée par une virémie relativement longue (35 à 91 jours) par rapport à celle des phacochères. Il a été prouvé aussi que le virus de la PPA persistait dans les tissus lymphatiques pendant au moins 34 semaines avec une quantité de particules virales allant de 10^2 à $10^{4.9}$ HAD₅₀/ml après l'infection (Anderson et al, 1998).

Concernant la capacité des potamochères à transmettre le virus de la PPA directement aux porcs domestiques, elle a pu être démontrée expérimentalement mais l'inverse ne semble pas possible, même si le porc domestique secrète une quantité importante de virus (Anderson et al, 1998). Cette observation suggère que le potamochère ne pourrait pas être infecté facilement par contact direct. Toutefois, cette hypothèse n'a jamais été confirmée. En conditions naturelles, si des porcs domestiques infectés meurent dans les zones de pâturage des potamochères, ces derniers pourraient être contaminés en ingérant des carcasses des porcs. L'inverse a déjà été observé pour des potamochères infectés dont les carcasses ont été ingérées par des porcs domestiques car suffisamment de particules virales persistaient dans les tissus infectés de potamochères (Anderson et al, 1998; Penrith et al, 2004).

La transmission horizontale du virus de la PPA entre potamochères n'est pas évidente expérimentalement, suggérant que ces animaux exigent des doses plus élevées de virus que les porcs domestiques pour être infectés (Anderson et al, 1998).

Enfin, la transmission du virus de la PPA de potamochères infectés à des tiques molles de l'espèce *O. moubata* a été démontrée expérimentalement (Anderson et al, 1998). Cependant, en conditions naturelles, il est peu probable que des potamochères cohabitent avec des tiques molles ornithodores puisqu'ils ne creusent pas de terriers favorables à l'hébergement de tiques molles mais fabriquent plutôt des nids dans la bauge, trop humide pour les tiques (Morel, 1969). Néanmoins, dans certaines régions d'Afrique où l'habitat de *P. larvatus* chevauche celui du phacochère et de *O. moubata*, le contact entre potamochères et tiques molles pourrait avoir lieu (Anderson et al. 1998; Roger et al. 2001).

Enfin, si l'hypothèse d'hybridation entre porcs domestiques et potamochères s'avérait exacte, la manière dont ces hybrides pourraient se comporter vis-à-vis du virus de la PPA serait à examiner.

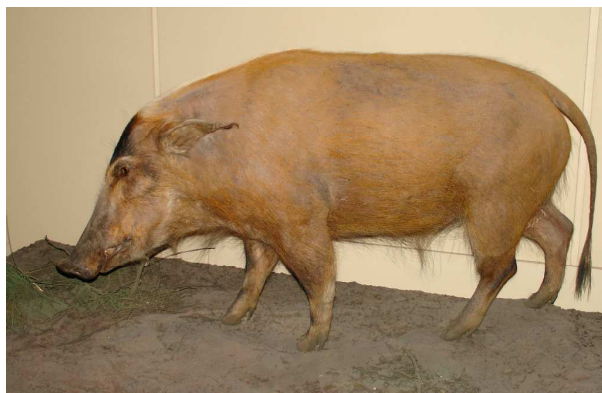


Figure 14 : *Potamochoerus porcus*

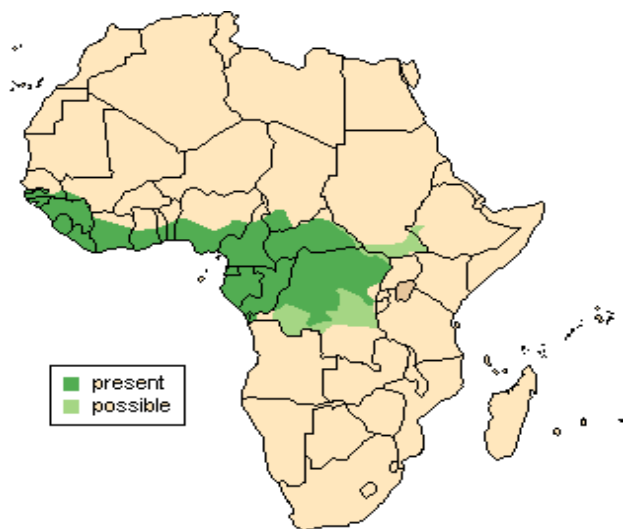


Figure 15 : Distribution géographique de *Potamochoerus porcus*
(http://www.ultimateungulate.com/Artiodactyla/Potamochoerus_porcus.html)



Figure 16 : *Potamochoerus larvatus*

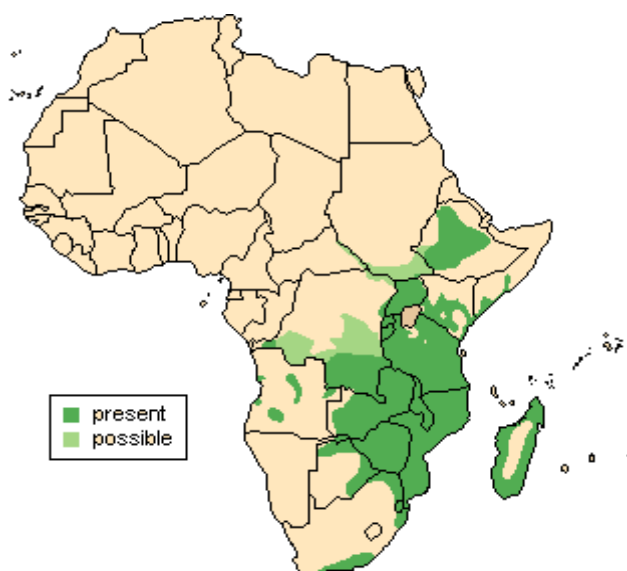


Figure 17 : Distribution géographique de *Potamochoerus larvatus*
(Source: [www.ultimateungulate.com/Artiodactyla/
Potamochoerus_larvatus.html](http://www.ultimateungulate.com/Artiodactyla/Potamochoerus_larvatus.html))

1.3. Les hylochères (*Hylochoerus meinertzhageni*)

L'hylochère (*Hylochoerus meinertzhageni*) (Figure 18), appelé aussi porc géant de la forêt, vit dans les forêts de montagne à haute altitude (3750m) en Afrique Centrale (**d'Huart, 2008**). Bien que cette espèce soit théoriquement susceptible au virus de la PPA (**Montgomery, 1921**), son rôle épidémiologique peut être considéré comme négligeable compte tenu de son contact peu probable avec des porcs domestiques tant que cette espèce vivra en forêts de haute altitude (**d'Huart 2008**). Toutefois, il a été rapporté une fois dans l'histoire l'infection naturelle d'un hylochère par le virus de la PPA (**Montgomery, 1921**).



Figure 18 : *Hylochoerus meinertzhageni*
(Source *Le Glaunec, 2006*)

1.4. Les sangliers (*Sus scrofa*)

Le sanglier ou porc sauvage est à l'origine un porc domestique qui s'est échappé ou a été libéré pour vivre à l'état sauvage. En Afrique, il est rencontré classiquement au Maroc et en Tunisie mais il semble qu'il ait été aussi introduit dans d'autres pays d'Afrique tels que l'Afrique du Sud, le Gabon, le Burkina Faso ou le Soudan, où une hybridation avec le potamochère a été suspectée (**Vercammen et al, 1993**). Sa présence est aussi rapportée en Eurasie, aux Caraïbes, dans les îles de l'Océan Indien et dans le Pacifique (Figure 19).

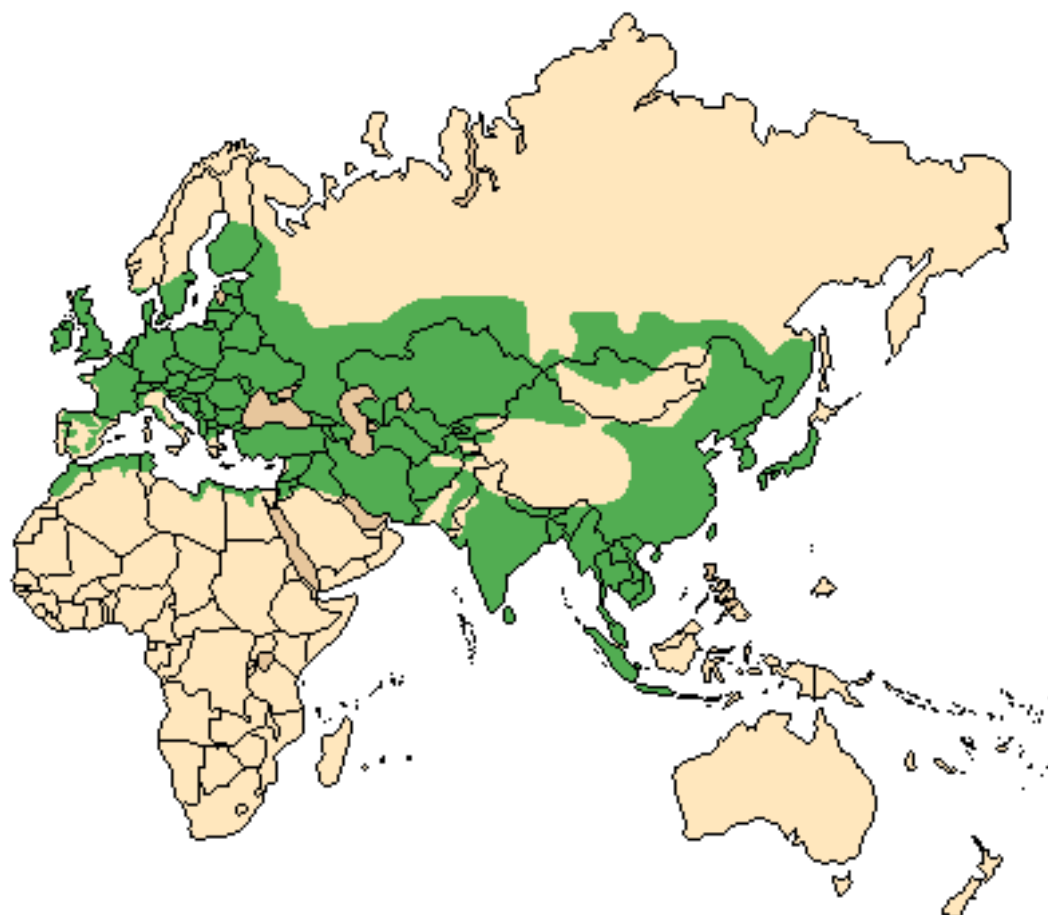


Figure 19 : Distribution géographique de l'espèce *Sus scrofa*
(Source: http://www.ultimateungulate.com/Artiodactyla/Sus_scrofa.html)

Le rôle épidémiologique de *Sus scrofa* pour la PPA n'est pas encore très clair (**Wilkinson, 1989**) malgré la présence de cette espèce dans plusieurs pays où la PPA s'est manifestée : Espagne et Portugal (**Arias et Sanchez-Vizcaino 2002a**), Sardaigne (**Laddomada et al, 1994 ; Mannelli et al, 1997 ; Mannelli et al, 1998**), Cuba (**Siméon-Negrin et Frias-Lepoureau, 2002**), Île Maurice et plus récemment plusieurs pays du Caucase (**Laddomada et al, 1994 ; Mannelli et al, 1997 ; Beltran Alcrudo et al, 2008**). Dans la péninsule ibérique, cette espèce est fortement susceptible à l'infection par le virus de la PPA, aussi bien en conditions naturelles que de manière expérimentale (**McVicar et al, 1981**) et sa population présente une mortalité massive du fait de l'infection (**McVicar et al, 1981 ; Laddomada et al, 1994 ; Bech-Nielsen et al, 1995 ; Perez et al, 1998**). Cependant, selon la virulence de la souche, quelques animaux semblent pouvoir survivre et possèdent alors des anticorps détectables par sérologie (**Perez et al, 1998**). Toutefois, durant les années 1990 en Espagne, le taux de sangliers séropositifs était inférieur à 0,5%, suggérant la forte létalité de la maladie chez les sangliers (**Bech-Nielsen et al, 1995**). Cette hypothèse est confirmée par la très grande susceptibilité au virus de la PPA rapportée chez les sangliers de Floride (**McVicar et al, 1981**) ou encore de l'île Maurice, où des porcs sauvages maintenus en captivité ont montré des taux de mortalité semblables à ceux notés chez les porcs domestiques (**Jori, communication personnelle**).

En principe, les sangliers excrètent les mêmes quantités de virus que les porcs domestiques et les dynamiques épidémiologiques chez les sangliers et les porcs domestiques sont très semblables en termes de transmission directe entre animaux malades et animaux sains susceptibles (**Arias et Sanchez-Vizcaino 2002a**).

1.5. Cas particulier de Madagascar

A Madagascar, le potamochère (*P. larvatus*) est le seul suidé sauvage. Il est appelé « lambo » ou « lambodia » ou « lamboala ». Il représente le seul grand mammifère sauvage représentant l'ordre des Artiodactyles. L'origine des potamochères malgaches est encore floue jusqu'à présent. Certains auteurs pensent que le potamochère malgache a été introduit d'Afrique durant l'immigration des populations humaines vers Madagascar (**Goodman et al, 2003**). Cette proposition repose sur l'hypothèse que le potamochère aurait pu être domestiqué ou semi-domestiqué avant son introduction sur l'île. Certains auteurs auraient retrouvé des indices de domestication du potamochère dans certaines zones d'Afrique (**Faure et Guerin, 1988**).

Les potamochères malgaches sont répartis sur une grande majorité du territoire, à l'exception des Hauts Plateaux. Ils ont une forte capacité d'adaptation aux divers types écologiques (**Vercammen et al, 1993**) : milieux boisés avec des points d'eau, forêt dense humide de la côte Est, forêt sèche semi-décidue de l'Ouest ou savanes arbustives du Sud. Ils peuvent être rencontrés au niveau des cultures dans les zones où la chasse est peu pratiquée par les riverains. Les densités les plus importantes et les plus grandes espérances de vie sont rencontrées dans les zones forestières qui constituent leur habitat idéal, en particulier dans les aires protégées, où ils restent à l'abri de leurs principaux prédateurs : l'homme, les chiens ensauvagés et l'espèce endémique *Cryptoprocta ferox* (**Goutard, 1999**). La taille des groupes familiaux peut inclure jusqu'à 10 individus.

Selon Cuvier, deux sous-espèces existent à Madagascar (**Cuvier, 1822**),

P. larvatus larvatus dont la distribution serait circonscrite sur la côte Ouest de Madagascar et sur les îles des Comores. Cette sous-espèce se caractérise par un pelage plus sombre et une taille supérieure à celle de la côte Est.

P. larvatus hova, localisée à l'Est de l'île et caractérisée par un pelage plus roux et une taille inférieure.

La taxonomie des potamochères malgaches reste encore ambiguë. Seules des études génétiques permettraient de déterminer précisément leur origine et de clarifier leur classification.

Concernant la proximité des potamochères et des porcs domestiques et leur capacité d'hybridation, le phénomène semble avoir été décrit à Madagascar dans des zones d'élevage porcin en divagation comme à Katsepy, Mahajamba, Soalala (**Goutard, 1999**). Toutefois, ces « hybrides » pourraient aussi être des porcs domestiques redevenus sauvages. Dans la région de Mariarano, par exemple, la présence d'hybrides a souvent été signalée alors que des exploitations porcines ont été abandonnées pendant les années 1960 et que plusieurs animaux auraient pu rester en divagation.

A Madagascar, le potamochère a longtemps été perçu par les organismes de conservation comme nuisible. Jusqu'à présent, la prédation du potamochère sur plusieurs espèces végétales et animales endémiques et la pression sur son environnement ont été souvent signalées mais rarement démontrées. En effet, le potamochère se nourrit principalement de racines, de champignons, de fruits tombés, de manioc et d'arachides. Il ajoute également à son menu des

insectes, des amphibiens, des reptiles, des œufs et des oisillons. Cependant, il existe un cruel manque de données sur cette espèce, ce qui ne facilite pas la confirmation de cette hypothèse mais il semblerait plutôt que ces animaux puissent jouer un rôle favorable dans la dissémination des graines par leurs déchets fécaux. Pourtant, leur classification comme espèce nuisible permet leur chasse pendant toute l'année. Cette activité approvisionne facilement en viande les populations riveraines des aires protégées et limite ainsi l'impact de la chasse sur d'autres espèces protégées.

A Madagascar, le commerce de la viande de potamochère représente un complément de revenu non négligeable pour l'économie familiale, surtout pour la population rurale qui obtiendrait en moyenne 10 animaux chassés par mois par chasseur, et vendus 1500 à 2000 Ariary le kilo. Cette situation s'est particulièrement accentuée avec l'apparition de la PPA, dont les foyers ont décimé une partie très importante du cheptel porcin domestique (**Rousset et al, 2001**). La viande de porc étant devenue rare dans la région, la demande s'est réorientée vers la viande de potamochère (**Jori, communication personnelle**). La capture et la commercialisation se concentrent en saison sèche et sont réduites pendant la saison des pluies. Dans la zone de Mahajanga, les principaux points de vente se trouvent dans les marchés de Mahajanga et Marovoay. Les animaux arrivent en général vivants et sont tués juste avant la vente. Ceux qui meurent avant d'arriver au point de vente sont éviscérés et boucanés pour retarder la putréfaction. Leur comportement moins farouche que celui observé en Afrique Centrale permet une tolérance beaucoup plus importante à la présence humaine, à la manipulation et au transport. Les animaux sont piégés par des groupes de chasseurs de niveau de vie très modeste, qui pratiquent la capture à partir de pièges trappes de fabrication artisanale ou « kotona » (Figure 20). Les animaux sont appâtés avec des mangues, des fruits de raphia ou des troncs de rhônier en fonction de la période. Récupérés du piège, les animaux sont maintenus pendant quelques jours dans un enclos de 12 m² environ, pour la vente. Dans certains cas, la chasse au fusil est aussi pratiquée, surtout dans le cadre de la chasse sportive, mais elle ne permet pas la conservation de la viande pour une vente ultérieure.



Figure 20 : Un type de piégeage artisanal « kotona » à Beronono

2. Les tiques molles du genre *Ornithodoros*

Les seuls réservoirs invertébrés du virus de la PPA connus en conditions naturelles sont des tiques molles (Argasidae) du genre *Ornithodoros*.

2.1. Biologie et écologie des tiques ornithodores

2.1.1. Taxonomie et distribution géographique

Les tiques appartiennent à l'ordre des Ixodida, lui-même divisé en deux familles : les Ixodidae comprenant les tiques dures, présentant un scutum sclérifié et les Argasidae incluant les tiques molles dépourvues de scutum sclérifié. Ces deux familles présentent des modes de vie et des écologies très différents (Vial, 2009).

Au sein des Argasidae, le genre *Ornithodoros* est le plus connu car nombreux de ses représentants sont des vecteurs compétents pour divers pathogènes animaux et humains, entre autres pour le virus de la PPA. Deux espèces ou groupes d'espèces de cette famille ont été identifiées comme réservoirs du virus dans la nature : L'*Ornithodoros erraticus* en Europe et les représentants du complexe d'espèces *Ornithodoros moubata* « *sensu lato* » en Afrique orientale et australe. En Afrique de l'ouest, le rôle des tiques en tant que vecteurs de la PPA n'a encore jamais été démontré. Toutefois, au Sénégal, bien que les tiques molles du complexe *O. moubata* soient absentes, il existe, comme cela a été indiqué plus précédemment, une autre espèce, *O. sonrai*, dont les caractéristiques morphologiques, bioécologiques et phylogénétiques sont proches de celles d'*O. erraticus* et qui a été retrouvée naturellement infectée par le virus de la PPA (Vial et al, 2007). Son rôle dans le cycle épidémiologique de la maladie reste cependant encore à démontrer.

O. erraticus est rencontré dans le bassin méditerranéen, sur la péninsule Ibérique (Caiado, 1988; Oleaga-Perez, 1990), en Afrique du Nord du Maroc à la Tunisie, et peut-être au Moyen-Orient. C'est une espèce proche d'*O. alactagalis* qui est présente en Turquie, Iran, Arménie et Azerbaïdjan (Gughusvili, 1980). *O. sonrai* est quant à lui principalement présent en Afrique de l'ouest, de la Mauritanie et du Sénégal au Mali, avec très probablement des extensions en Egypte et au Maroc (Vial et al, 2006b ; Trape et al, 1996 ; Hoogstraal, 1985). Certains auteurs pensent que ces trois espèces constitueraient en fait un complexe d'espèces très proches les unes des autres, selon un cline de spéciation nord-sud pour *O. erraticus* et *O. sonrai* et un cline est-ouest pour *O. erraticus* et *O. alactagalis* (Chabaud, 1954 ; Balashov, 1971). Dans la présente étude, nous ne considérerons qu'*O. erraticus* comme vecteur avéré de PPA.

Le complexe d'espèces *O. moubata* (Walton, 1962) comprend 4 espèces : *O. compactus* et *O. apertus* ne présentant pas d'intérêt épidémiologique avéré et parasitant les terriers de tortues et de porc-épics, respectivement, et *O. moubata sensu stricto* et *O. porcinus* transmettant toutes deux le virus de la PPA et parasitant les habitats de certains suidés sauvages et les habitations humaines ou les porcheries (Walton, 1962 ; Rodhain, 1976 ; Uilenberg, 1963). *O. moubata sensu lato* est absente d'Afrique de l'ouest. Toutefois, sa présence aurait été rapportée au Ghana (Hoogstraal, 1954 ; Walton, 1962) mais cette existence n'a jamais été redémontrée depuis, ce qui suggère une erreur d'identification lors de la collecte. En Afrique de l'est, Afrique australe et à Madagascar, elle est par contre largement représentée : au Kenya, en Tanzanie, en Uganda (Pierce, 1974 ; Walton, 1979), en Ethiopie, Somalie, à Mozambique, au Rwanda, en Afrique du Sud (Morel, 1969). Enfin, en Afrique Centrale, certains pays

comme l'Angola, le Congo semblent aussi infestés bien que leur climat semble moins propice à l'installation de représentants du complexe *O. moubata sl* (Morel 1969).

2.1.2. Cycle de développement

Le cycle de développement des ornithodores est polyphasique et comprend trois stades qui sont le stade larvaire, le stade nymphal et le stade adulte (Figure 21). L'accouplement entre les deux sexes suit immédiatement le repas de chacun des deux adultes ; s'il peut se produire avant le repas de la femelle, il a toujours lieu après celui du mâle. La fertilité est plus grande si à chaque repas correspond un accouplement ; la fertilité décroît à mesure que le temps augmente entre l'accouplement et le repas. L'ingestion de sang est également nécessaire pour assurer la ponte, en absence ou en présence d'accouplement, car les femelles sont capables de retenir le sperme du mâle dans des endospermatophores. Pour une femelle, il existe 6 à 7 pontes, et pour chaque ponte le nombre d'œufs émis varie de 86 à 327 (selon la température et l'humidité).

Suite à la ponte, les œufs se développent dans le sol pendant 9 à 12 jours pour éclore et donner naissance à une larve. Cette dernière reste le plus souvent immobile et se dégage ou pas des membranes de l'œuf. Pour le complexe *O. moubata sl*, la nymphe de premier stade fait directement suite à cette larve inactive au bout de 5 à 6 jours, lors de la mue larvaire qui constitue une réelle métamorphose, et ceci sans repas sanguin préalable de la larve. Pour *O. erraticus* et *O. sonrai*, un repas larvaire est nécessaire.

Le nombre des stades nymphaux est ensuite variable pour chaque espèce et selon les conditions environnementales de température et d'humidité. Chez *O. porcinus*, le nombre de stades nymphaux varie de 4 à 7, de 5 à 6 chez *O. moubata ss*, et de 4 à 5 chez *O. erraticus* et chez *O. sonrai*. Entre chaque stade nymphal, il peut s'écouler 9 à 20 jours en moyenne. Chaque mue nymphale (fausse métamorphose) donnant naissance au stade nymphal suivant, et à l'adulte pour le dernier stade nymphal, nécessite un repas sanguin.

Un cycle complet de développement (Figure 21) prend en moyenne 76 à 155 jours pour *O. porcinus*, 36 à 113 jours pour *O. moubata ss*, 51 à 158 jours pour *O. erraticus* et pour *O. sonrai*.

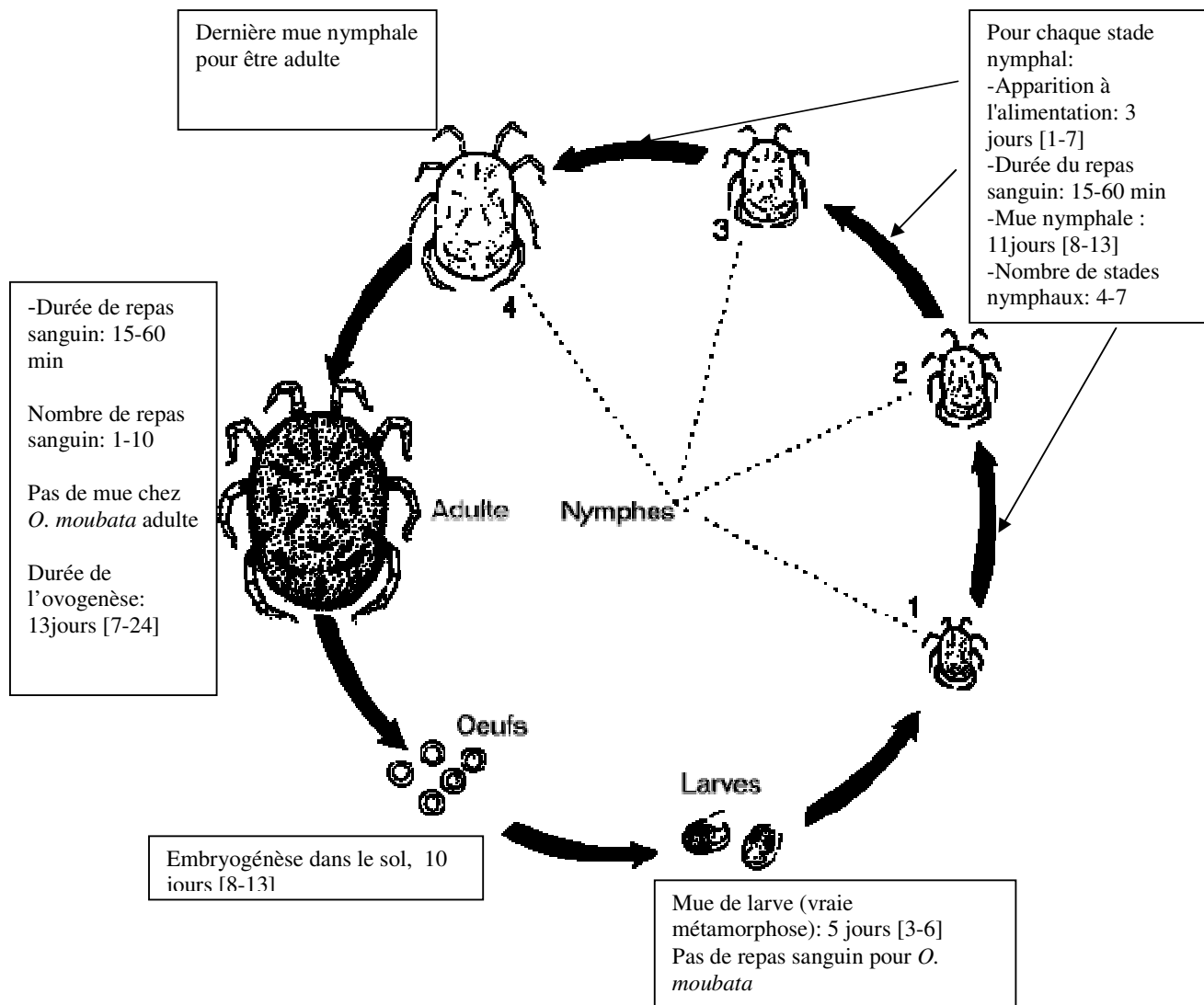


Figure 21 : Un cycle de vie typique des tiques molles *O.moubata*

Ce cycle indique les différents stades de développement d'une tique molle. La durée de chaque étape est décrite dans la case rectangulaire (selon **Morel, 1969 ; Cunliffe, 1921 et Lomis, 1961**)

2.1.3. Repas sanguin

Comme pour la majorité des tiques molles, le repas sanguin chez les ornithodores est de courte durée, de 15 à 60 minutes selon l'espèce, le stade et les conditions de gorgement (**Morel, 1969**). Chez *O. erraticus* et *O. sonrai*, le repas sanguin de la larve peut par contre durer plusieurs jours (**Morel, 1969**). Dès la fin du repas sanguin, la tique se détache de son hôte, ce qui explique qu'il est rare de trouver des tiques molles directement sur leur hôte mais plutôt dans l'habitat de ce dernier.

Les tiques molles ont développé une stratégie physiologique pour favoriser une prise du sang plus rapide sur l'hôte, comme la forte distension du tégument pendant le repas sanguin ou l'excrétion d'excès d'eau et des ions par des glandes coxales (= liquide coxal) dès que le sang est ingéré ou juste après le détachement des tiques (**Hoogstraal, 1985**).

Chez les nymphes et les adultes, le repas sanguin est important pour la poursuite du cycle de développement puisque chaque passage au stade suivant nécessite le gorgement préalable sur un hôte vertébré. Le repas sanguin est également indispensable à la ponte chez les femelles.

Lors du repas sanguin, certains pathogènes hébergés par les tiques tels que le virus de la PPA ou les borrélioses de fièvres récurrentes peuvent être excrétés dans le liquide coxal et multiplier ainsi les voies de transmission du pathogène (**Gaber et al, 1984 ; Kleiboeker et al, 1998**).

2.1.4. Longévité

Les adultes ornithodores ont une durée de vie très longue, de 14 mois à cinq ans (**Morel, 1969**), et qu'ils peuvent s'alimenter plusieurs fois (jusqu'à 10) tant que les hôtes sont disponibles (**Morel, 1969**). Les fortes températures provoquent un accroissement du nombre d'œufs et une évolution plus rapide de chaque stade, mais également d'une diminution de la fertilité et de la longévité (**Cunliffe, 1921**).

2.1.5. Habitats

Les tiques du genre *Ornithodoros* vivent généralement dans le sol, la terre ou le sable (Sonenshine, 1993), quel que soit le stade de développement. Elles sont dites « endophiles » et « photophobes ».

En milieu naturel, *O. moubata* *sl* s'enterre ordinairement dans le sol meuble des terriers de grandes dimensions de grands mammifères tels que les phacochères (Morel, 1969). Il peut aussi être rencontré dans des excavations naturelles (grottes, baobabs creux, etc.). Toutefois, certains de ses représentants peuvent être retrouvés en milieu domestique. En effet, les *Ornithodoros* de terriers semblent s'adapter d'une façon remarquable à l'habitation humaine. Dans les huttes au sol en terre durcie d'Afrique de l'est et d'Afrique australe, la tique se réfugie dans les failles de la terre battue ou dans les fissures des cloisons, dans les fentes des poteaux et de la charpente (Morel, 1969). Elle peut aussi demeurer à la surface du sol cachée sous divers objets, outils, planches, tissus, etc.... (Sonenshine, 1993). Lorsque le sol est humide, *Ornithodoros* s'abrite dans les fissures des murs, à une hauteur convenable pour éviter les effets de l'humidité (Walton, 1964). Walton (1962) suggère que l'espèce *O. porcinus* se divise en deux sous-espèces dont une forme « domestique » (*O. p. domesticus*), présente dans les habitations humaines et les porcheries, et une forme « sauvage » (*O. p. porcinus*), présente dans les terriers de phacochères. Plus tard, il propose une distinction entre les 2 sous-espèces basée sur des critères morphologiques mais il est moins strict sur leur répartition entre milieu sauvage et milieu domestique puisque certains chevauchements semblent pouvoir exister (Van Der Merwe, 1968). Cette révision est associée à l'hypothèse que les tiques « domestiques » auraient évolué à partir des tiques « sauvages ». De même, il existerait une souche « domestique » et une souche « sauvage » d'*O. moubata* *ss* (Walton, 1962).

O. erraticus et *O. sonrai* préfèrent les terriers de petites dimensions de rongeurs myomorphes et sciurormorphes ou d'insectivores (Morel, 1969). Même en milieu domestique, ils colonisent des terriers de rongeurs commensaux qui parfois débouchent dans les habitations humaines ou dans les bâtiments d'élevage, ce qui permet leur contact avec les hommes ou les porcs et la transmission de pathogènes à ces derniers (Morel, 1969 ; Vial, 2007).

2.1.6. Hôtes

Pour les tiques molles du complexe *O. moubata* *sl*, le parasitisme des phacochères semble primitif. Expérimentalement, *O. moubata* *sl* peut aussi se nourrir sur les potamochères.

Cependant, en conditions naturelles, il est peu probable que des potamochères maintiennent une relation étroite avec des tiques molles puisqu'ils ne creusent pas de terriers mais constituent plutôt des nids ouverts faits d'herbe et de boue (**Vercammen et al, 1993**). Néanmoins, dans certaines régions d'Afrique où il existe un chevauchement d'habitat entre le potamochère, le phacochère et les tiques molles *O. moubata sl*, le contact entre le potamochère et ces tiques molles pourrait avoir lieu (**Anderson et al, 1998; Roger et al, 2001**).

Plusieurs études menées en Afrique de l'est et australe ont également montré que *O. moubata sl* a pu être retrouvé en abondance dans des porcheries, où il se gorge alors sur porcs domestiques (**Haresnape, 1988 ; Morel, 1969 ; Uilenberg, 1963**). Les souches dites « domestiques » d'*O. moubata ss* et d'*O. porcinus* semblent aussi très bien s'adapter à l'homme (**Haresnape, 1988 ; Walton, 1962**).

En Afrique australe, les tiques *O. moubata ss* semblent pouvoir s'adapter au poulet domestique et ont été trouvées à plusieurs occasions dans des poulaillers, dans une situation entièrement analogue à celle d'*Arqas persicus* (**Bedford, 1924 ; Ordman, 1941**). Par contre, expérimentalement, les tiques originaires de terriers de phacochères refusent catégoriquement de se gorger sur rat blanc (**Heisch, 1950**). De même, les tiques ornithodores ont parfois des difficultés à s'alimenter sur les oreilles de lapin (**Walton, 1962**). Cependant, certaines souches de laboratoire semblent s'y être finalement habituées. Enfin, des ornithodores adultes nourries sur des reptiles comme des caméléons meurent en grande quantité car il semble que le sang des caméléons soit toxique pour ces tiques (**Rodhain, 1922**). En revanche, des nymphes peuvent accepter de s'alimenter sur serpent (vipère), seulement si c'est la première fois (**Van Hoof, 1924**). Ces résultats suggèrent une certaine ubiquité d'*O. moubata sl* vis-à-vis de ses hôtes vertébrés et plutôt une sélection d'habitats qui secondairement entraîne une sélection d'hôtes (**Vial, 2009**).

La même situation est observée pour *O. erraticus* et *O. sonrai*. Ainsi, *O. erraticus* parasite essentiellement des rongeurs ou des insectivores en Afrique du nord alors qu'il est associé plutôt aux porcs domestiques sur la péninsule Ibérique. En Afrique de l'ouest, *O. sonrai* n'a été retrouvé que dans des terriers de rongeurs en milieu sauvage ou domestique. Toutefois, la contamination de l'homme par des *Borrelia* prouve que cette tique est capable de se gorger sur l'homme (**Rebaudet et Parola, 2006 ; Haresnape, 1988 ; Walton, 1962**). De même, l'infection naturelle de cette tique par le virus de la PPA alors que ce dernier n'a pour hôte naturel que les suidés sauvages et domestiques suggère bien qu'elle est capable de se gorger sur porc (**Vial, 2007**). Au Portugal, des tiques *O. erraticus* gorgées ont été trouvées dans les

nids d'oiseaux sur les lieux infestés, indiquant que les oiseaux peuvent aussi être des hôtes probables pour cette espèce (**Boinas, 1995**).

2.1.7. Conditions climatiques de survie et de développement

Les études menées par **Lees (1947)** ont démontré qu'au-dessus de la température critique de la cire cuticulaire (60°C) l'imperméabilité de la couche protectrice d'une tique molle diminue brusquement en raison des modifications physico-chimiques et l'évaporation s'accroît d'une façon considérable. Cependant, *O. moubata ss* tolère une température de l'air de 63°C (**Morel, 1969**). Le seuil de tolérance pour *O. porcinus*, *O. erraticus* et *O. sonrai* n'est pas connu mais doit être assez similaire. Ce constat explique la présence principalement de ces tiques molles dans des zones tropicales et subtropicales, avec une extension en régions arides d'Asie centrale et d'Afrique (Sahara) (**Morel, 1969**).

Toutefois, il existe un énorme gradient de température et d'humidité où l'on peut rencontrer des spécimens du complexe *O. moubata sl* ou du groupe *O. erraticus* au sens large. Pour *O. moubata sl*, certaines tiques colonisent des milieux semi-désertiques chauds d'Afrique australe, d'autres des montagnes humides et froides d'Afrique de l'est ou encore des zones littorales chaudes et humides de la côte est africaine (**Walton, 1962**). Pour *O. erraticus* et *O. sonrai*, (Voir Annexe 11) certains spécimens s'adaptent au climat méditerranéen avec des hivers froids et des été chauds alors que d'autres colonisent la zone océanique d'Afrique de l'ouest avec un climat plus tempéré. Ces observations s'expliquent principalement par leur endophilie, l'habitat souterrain tamponnant les variations climatiques extérieures pour fournir des conditions de température et d'humidité relativement stables à l'intérieur de l'habitat (**Vial, 2009**). Ainsi, ces tiques peuvent être rencontrées dans des régions inhabituelles grâce aux conditions microclimatiques régnant dans leur habitat souterrain. En outre, l'hypothèse d'adaptation locale peut être avancée comme le proposait Walton (1962) qui décrivait différentes « races » d'*O. porcinus* au Kenya.

Les conditions particulières de température et d'humidité permettent la réalisation du cycle de développement, processus exigeant des conditions climatiques plus strictes que la simple survie de la tique (**Oleaga-Perez et al, 1990 ; el Shoura, 1987 ; Morel, 1969 ; Loomis, 1961 ; Robinson, 1942 ; Jobling 1925 ; Cunliffe, 1921**).

2.2. Les tiques molles *Ornithodoros* et la PPA

2.2.1. Mise en évidence de l'association tique-virus

La première association entre le virus de la PPA et les tiques ornithodores a été mise en évidence par **Sanchez-Botija (1963)** qui a isolé le virus à partir de la tique molle *Ornithodoros erraticus* en Europe (Voir Annexe 11). Depuis, il a été démontré que plusieurs espèces de tiques du genre *Ornithodoros*, colonisant les habitats des suidés sauvages et parfois domestiques sur lesquels elles se gorgent, peuvent aussi jouer le rôle de vecteurs biologiques dans le cycle de transmission du virus (**Sanchez Botija, 1963 ; Haresnape, 1989**). C'est le cas en Afrique australe et orientale où l'association tique/phacochère est observée dans la plupart des pays touchés par la PPA (**Thomson, 1985**). La circulation asymptomatique du virus au sein des suidés sauvages et des tiques molles ornithodores est à l'origine d'un cycle dit « sauvage » de transmission permettant le maintien du virus à l'état naturel (**Parker et al, 1969**)

Au Portugal et en Espagne, la persistance du virus dans les fermes s'explique par l'infection naturelle de la tique *O. erraticus* par le virus de la PPA (**Boinas et al, 2001a; Perez-Sanchez et al, 1994; Sanchez-Botija, 1963; Vigario et Caiado, 1989**). Il semblerait que cette tique, endémique alors en Espagne et au Portugal, ait été infectée par le virus de la PPA à partir de porcs domestiques contaminés lors de l'introduction de la maladie et serait ainsi devenue progressivement réservoir du virus. En Espagne, le virus de la PPA était isolé 4 mois après l'épizootie à partir de la tique *O. erraticus* par Sanchez (**Sanchez-Botija, 1963**) et le virus pouvait persister jusqu'à huit années après l'infection (**Sanchez-Botija, 1982 ; Boinas, 1995**). Cette observation a été confirmée expérimentalement par Boinas en 1995 sur des tiques collectées dans une ferme deux années après l'épizootie. Ces tiques ont été gardées au laboratoire pendant trois ans sans se nourrir avant que le virus de la PPA y soit détecté (**Boinas, 1995**).

En Afrique, le premier isolement de virus à partir d'une tique ornithodore du complexe d'espèces *O. moubata sl* à été réalisé par Plowright (1969) sur des tiques collectées dans des terriers de phacochères (**Plowright et al, 1969**). En 1970, Plowright a réalisé expérimentalement une infection des tiques d'Ouganda de l'espèce *O. porcinus spp* par une souche ougandaise en les nourrissant sur un porc virémique (**Plowright et al, 1970**). Le virus persistait durant 13-15 mois chez 70-75% des tiques. Lors de nourrissage artificiel avec du sang de porc contaminé, le minimum de dose infectante pour infecter des tiques était environ de $10^{0,9}$ HAD₅₀. Le titre viral observé chez toutes les tiques était supérieur à 10^4 HAD₅₀. Plus

tard, Kleiboeker (**Kleiboeker, 1998; Kleiboeker, 1999**) a également réalisé une infection des tiques appartenant à l'espèce *O. p. porcinus* avec une souche virale d'Afrique du Sud. L'infection généralisée des tissus de la tique par le virus a été obtenue deux à trois semaines après le repas sanguin. Un titre viral élevé, allant de 10^4 à 10^6 HAD₅₀/mg, a été observé dans les glandes salivaires et dans le tissu de l'appareil reproducteur de la tique.

Afin d'évaluer les risques d'endémisation de la maladie par installation dans des tiques molles locales, d'autres espèces de tiques ornithodores ont été testées pour leur compétence vectorielle vis-à-vis du virus de la PPA. En 1985, l'infection expérimentale d'*O. savignyi*, une tique se trouvant en Afrique subsaharienne et saharienne, a été réalisée avec succès (**Miller et al, 1985**). La transmission du virus de cette tique à un porc domestique a aussi été mise en évidence. Cette tique est donc un vecteur potentiel de la PPA. Au Caraïbes et en Amérique du Nord, des études ont prouvé expérimentalement que certaines tiques du genre *Ornithodoros* pouvaient s'infecter et transmettre le virus de la PPA (**Groocock et al, 1980 ; Hess et al, 1986 ; Endris et al, 1991**). Selon **Hess** en 1986, l'espèce *O. coriaceus* (Voir Annexe 11) pouvait héberger et transmettre le virus de la PPA pendant au moins 440 jours. Le virus peut passer par voie trans-stadiale et peut être maintenu pendant au moins les quatre mues. Le passage du virus par voie transovarienne n'a pas été démontré. Presque 40% des tiques infectées mourraient, apparemment, de l'infection par le virus. Lors de ses études, Hess a aussi pu démontrer que les tiques *O. turicata* collectées en Floride (Voir Annexe 11) étaient également sensibles au virus de la PPA et pouvaient le transmettre par morsure aux porcs susceptibles. Quant aux tiques *O. puertoricensis* collectées en République Dominicaine et en Haïti (Voir Annexe 11), non seulement elles ont été aisément infectées expérimentalement, mais elles pouvaient également transmettre le virus par voies transtadiale et transovarienne. Enfin, des tiques de l'espèce *O. parkeri* (d'une colonie établie depuis longtemps en laboratoire) pouvaient rester porteuses du virus au moins au cours d'une mue, mais elles ne pouvaient pas le transmettre aux porcs susceptibles (**Hess et al, 1986**).

2.2.2. Interaction entre la tique molle et le virus

La dose minimum de virus nécessaire pour infecter une tique lors d'un repas de sang virémique est de l'ordre de 10 à 10^2 HAD₅₀/ml, charge virale rencontrée uniquement chez les porcs domestiques et les jeunes phacochères (**Thomson, 1980**). L'infection commence dans l'épithélium de l'estomac où le virus se multiplie et se maintient pendant au moins 50 semaines (**Greig, 1972 ; Plowright, 1970**). Le virus traverse ensuite la barrière intestinale

pour aller dans l'hémocoel et infecter en 24H à 48H les autres tissus comme les glandes coxales, les glandes salivaires, les gonades (**Plowright et al, 1974**). La tique excrète le virus dans le fluide coxal, les excréments malpighiens, les sécrétions salivaires et les sécrétions génitales femelles (**Plowright et al, 1974 ; Greig, 1972**).

Expérimentalement, le titre viral dans les glandes salivaires et les gonades est d'environ 10^4 à 10^6 HAD₅₀/mg chez *O. moubata sl* (**Kleiboeker, 1998**) ; chez *O. erraticus*, il est de 10^5 à 10^6 HAD₅₀/mg (**Boinas, 2004**). Par contre, sur le terrain, la quantité de virus trouvé dans les tiques infectées est plus faible, au maximum $10^{4.3}$ HAD₅₀/tique (**Basto, 2006 ; Boinas, 1995**). Des études expérimentales avec *O. erraticus* montrent que le taux d'infection diminue dans les tiques oralement infectées, tandis qu'il est plus élevé et stable chez des tiques infectées par inoculation, suggérant l'existence d'une barrière à l'infection au niveau intestinal (**Boinas, 1995**).

Une fois dans la tique molle, le virus persiste très longtemps, des mois voire des années (**Greig, 1972 ; Plowright, 1970**).

2.2.3. Prévalence d'infection chez la tique

Les taux d'infection chez la tique varie selon les espèces, les stades de développement, les zones géographiques, le temps entre la collecte et l'apparition de la PPA.

En Europe, au Portugal, la prévalence d'infection d'*O. erraticus* variait de 0,5% à 6,4% pour des tiques collectées 1017 jours (2 ans et 9 mois) après un foyer de PPA, et peut être de 43% si les tiques sont collectées durant l'épizootie (**Basto, 2006 ; Boinas, 1995**).

En Afrique, au Malawi, le taux d'infection d'*O. moubata sl* collectées dans les porcheries variait de 1% à 3% (**Haresnape, 1988**), et ce taux pouvait atteindre 11% à 24% quelques mois après un foyer de PPA (**Haresnape, 1989**). Ce taux est semblable à celui qui a été rapporté pour des tiques sauvages habitant dans des terriers des phacochères (**Plowright, 1981**).

2.2.4. Diversification du virus dans la tique

Des variations de diversité génétique virale ont été observées selon la localisation géographique des isolats et/ou le type d'hôte sur lequel le virus a été détecté. Ainsi, des isolats issus de tiques collectées en Zambie dans des terriers de phacochères ont montré une diversité génétique bien supérieure à celle observée sur des isolats circulant uniquement sur porcs domestiques (**Dixon, 1988**). Cette diversité ne correspondait pas à des délétions/insertions de

la partie gauche terminale du génome, classiquement décrites pour des phénomènes de « filtre d'hôte », mais à des mutations ponctuelles tout le long du génome (**Dixon, 1988**). En outre, une diversité génétique considérable a été observée entre les isolats de virus de tiques collectées dans les mêmes régions, voire les mêmes terriers de phacochères (**Dixon, 1988**). Plus tard, d'après des études de séquençage du gène VP72 par Bastos (**2003**) et Lubisi (**2005**) en Afrique australe et orientale, les virus issus de tiques ornithodores et/ou de phacochères avaient une grande variabilité génétique et divergeaient de ceux circulant uniquement au sein de porcs domestiques. Ces résultats suggèrent d'une part que la circulation du virus de la PPA dans des tiques et/ou des phacochères maintient par pression de sélection certains gènes nécessaires à la réplication virale dans ces organismes (pression disparaissant chez les porcs domestiques et entraînant des délétions en partie gauche terminale) et d'autre part que les tiques auraient, à elles seules ou en interaction avec les suidés sauvages, un « effet diversifiant » sur le virus de la PPA, effet dont les mécanismes et les conséquences restent encore totalement inconnus.

A Madagascar, en utilisant les séquences des gènes p22 et p32 du virus, Michaud (**2007**) a détecté une divergence génétique relativement élevée entre les différents isolats malgaches disponibles, depuis l'introduction de la maladie en 1998 jusqu'en 2003, comparée à celle observée sur des isolats d'Afrique de l'Ouest ou d'Europe ayant évolué après introduction pendant un laps de temps similaire, voire supérieur. Ce résultat est en faveur de l'hypothèse que le virus de la PPA, introduit à Madagascar en 1998 s'est adapté aux hôtes sauvages (potamochère et/ou tique) et s'est diversifié au sein de ces hôtes.

2.2.5. Modes de transmission du virus par la tique

2.2.5.1. Entre porc domestique et tique

Expérimentalement, Parker (1969) a prouvé que des tiques saines pouvaient acquérir le virus en s'alimentant sur des porcs infectés ayant une virémie variant entre 10^6 à 10^8 HAD₅₀/ml. 10 à 10^2 HAD₅₀/ml de particules virales seraient théoriquement suffisant pour infecter des tiques durant leur repas sanguin, mais pour atteindre une infection persistante dans 50% de tiques, une quantité virale plus élevée est nécessaire. Certains isolats à 10^5 HAD₅₀/ml peuvent produire une infection persistante dans les tiques (**Plowright, 1981**). Des études expérimentales ont aussi montré que des porcs sains peuvent être infectés par la morsure de tiques infectées (**Edwards, 1985 ; Ekue, 1989 ; Greig, 1970**).

2.2.5.2. Entre phacochère et tique

Un phacochère infecté avec une virémie de 10^3 à 10^4 HAD₅₀/ml au maximum peut infecter des tiques (**Thomson, 1980**). Cette quantité virale n'a été observée que chez les phacochères nouveaux nés ou chez des jeunes âgés de moins d'un an, alors qu'ils étaient nés sains et étaient devenus infectés après morsure d'une tique. Cette quantité de particules virales n'a jamais été enregistrée dans des phacochères adultes (**Heuschele, 1969 ; Parker, 1969**).

2.2.5.3. Entre tiques molles

La transmission du virus de la PPA d'une tique à une autre peut être trans-stadiale, transovarienne et sexuelle. La transmission trans-stadiale a été démontrée par Hess (**Hess, 1989**) qui a maintenu des colonies d'*O. moubata sl* infectées par le virus de la PPA en laboratoire au Zimbabwe : ces tiques étaient restées infectées pendant au moins un an.

La transmission transovarienne a été démontrée sur le terrain par Plowright (**Plowright et al, 1970**) sur les espèces *O. moubata porcinus* collectées dans des terriers de phacochères au nord de la Tanzanie. Trois femelles infectées transmettaient le virus de la PPA à leurs œufs et ensuite, après éclosion, aux nymphes avec un taux d'infection élevé d'environ 67 à 78%. Les nymphes infectées par voie transovarienne transmettaient régulièrement à leur tour le virus aux porcs domestiques lors du repas sanguin. Parallèlement, 4 pools de nymphes de premier stade non nourris collectés dans des terriers de phacochères contenaient du virus de la PPA. En 2001, Rennie redémontre cette voie de contamination par des infections expérimentales en laboratoire sur *O. moubata* avec un isolat de virus zambien (**Rennie, 2001**). Les œufs de tiques infectées par des souches différentes présentent des prévalences d'infection différentes allant de 1,2% à 35,5% pour les tiques infectées avec la souche de LIV 13/33 et de 1,8% à 31,8% pour celles infectées avec la souche VICT90/1.

La transmission sexuelle a été prouvée avec un isolat ougandais sur *O. moubata* par Plowright (**Plowright, 1974**), avec un taux de transmission du virus du mâle à la femelle de 87,6%.

2.3. Spécificités sur la tique molle malgache *Ornithodoros porcinus* spp.

2.3.1. Historique et distribution géographique

A Madagascar, on connaît l'existence de trois espèces de tiques ornithodores, *O. (Pavlovskyella) grenieri* (**Klein 1965**), *O. (Reticulinasus) madagascariensis* (**Hoogstraal 1962**) et *O. (Ornithodoros) moubata porcinus* (**Walton 1962**), et d'une espèce d'*Otobius*, *Ot. Megnini* (**Diges 1884**), proche morphologiquement et écologiquement des trois premières

(Bück, 1949). Seules *O. porcinus* et *Ot. Megnini* ont été décrites comme pouvant parasiter l'homme et les animaux domestiques tels que le porc pour *O. porcinus* ou le cheval, le bovin, le mouton et le chien pour *Ot. Megnini*. L'une comme l'autre ont été introduites d'Afrique via les animaux domestiques qu'elles parasitent.

Dans la Grande Ile, la tique *O. porcinus*, anciennement nommée *O. moubata* pour les études datant d'avant la reclassification de Walton (1962), a été signalée en premier lieu par Lamoureux en 1913 comme vecteur de la fièvre récurrente ou la borréliose qui a été détectée pour la première fois à Madagascar chez une jeune fille résidant à Marovoay (Theze, 1911). La maladie est causée par un spirochète, *Borrelia duttoni*, et sévit principalement dans les régions de Mahajanga et de Marovoay (Lamoureux, 1913 ; Colas-Belcour et al, 1952). L'identification de la tique a été confirmée par Chatton et Roubaud en 1913. La tique a été retrouvée ensuite dans la région de Mahajanga et à Mitsinjo et tout le long de la côte Ouest où la fièvre récurrente était fréquente, à Morondava, Maintirano, Besalampy et Antsalova et à Soalala où un important foyer existait (Néel et al, 1949). Par ailleurs, les habitants de ces régions semblaient bien connaître les tiques ornithodores qui étaient très fréquentes dans les maisons et qu'ils dénommaient « Kongon'Morima » ou tiques coureuses (Decary et Poisson, 1930). Selon Suldey (1916), ce terme signifiait « punaise des Makoas » pourrait indiquer l'introduction de ces tiques à partir de la côte Ouest de Madagascar. Cependant, ces ornithodores n'étaient généralement pas incriminées dans la transmission de la maladie car celle-ci était considérée par certains comme une « Fièvre de l'Ouest » liée à l'arbre « Komanga » (*Erythrophleum couminga* Baillon, famille des légumineuses) (Suldey, 1916 ; Decary et Poisson, 1930) qui, au moment de la floraison, présente de graves effets toxiques. A cette époque, Poisson remarquait que l'aire de répartition géographique du « Komanga » semblait coïncider à peu près à celle de l'*Ornithodoros moubata*. Toujours à la même époque, Drury (1702-1720), lors de son voyage à Madagascar, constatait la présence de tiques appelées « Poroponjy » dans les maisons des « Vazimba » tout le long de la côte ouest entre Maintirano et Morondava. Les gens qui étaient mordus par ces tiques tombaient malades pendant six semaines à deux mois mais, une fois mordu et malade, ils n'avaient plus à les redouter et n'en étaient plus jamais incommodés par la suite. (Néel, 1949).

Plus tard, dans la région du Moyen Ouest à Mahasolo, une tique très similaire à celle transmettant la fièvre récurrente fut signalée pour la première fois dans les porcheries en 1949 puis en 1962 (Uilenberg, 1963). Au même endroit, l'examen de quelques habitations

humaines donnait par contre des résultats négatifs et la fièvre récurrente ne semblait pas être connue des habitants de la zone de Mahasolo. Cette information n'était donc pas, à cette époque, en faveur de l'existence d'une espèce unique infestant indistinctement les habitations humaines ou les porcheries. Par la suite, ces mêmes tiques furent récoltées dans les porcheries en 1979 (**Uilenberg, 1979**) puis en 1988 (**Rodhain, 1988**).

Enfin, lors des foyers de PPA à Madagascar en 1997-2000, des tiques molles *O. porcinus* ont été récoltées par Roger dans la zone des Hautes Terres à Mahitsy et Andralanitra, et à Tsinjoarivo, zone au Sud de la capitale (**Roger et al, 2001**). Bien que la recherche de virus de la PPA n'ait pas été réalisée à l'époque sur ces tiques, leur présence dans les porcheries en étroite association avec des porcs domestiques malades suggérait très fortement leur rôle dans l'épidémiologie de la PPA à Madagascar.

2.3.2. Classification et taxonomie

A Madagascar, les recherches réalisées par Uilenberg en 1963 ont permis de classer les tiques trouvées dans les porcheries de la région du Moyen Ouest à Mahasolo en 1962 dans l'espèce *O. porcinus*, nouvellement créée par **Walton (1962)**, et dans la sous-espèce *O. porcinus domesticus* (**Uilenberg, 1963**). Ces tiques se rapprochent de la sous-espèce d'*O. p. domesticus* par les caractères suivants (**Uilenberg, 1963**) : les soies frontales atteignent le bord latéral du trochanter II ou le dépassent ; les soies post-hypostomales font au moins 2/3 de la longueur de l'hypostome ; l'apex des chélicères est délicat et les dents mobiles sont petites ; les trochanters ont tous une constriction subapicale ; l'organe de Haller est petit ; il existe sur les femelles une dépression subrectangulaire entre la région capitulo-vulvaire et le labium antérieur de la vulve ; le pli postérieur de la vulve délimite une région semi-circulaire et non triangulaire ; les mâles sont remarquablement grands (5,6 x 4,2mm en moyenne). Uilenberg (**1963**) a noté également dans ses études que la taille des tiques femelles collectées est en moyenne de 8,6 x 6,5 mm, alors que Walton indique pour *O. p. domesticus* 6,7-9 x 4-6,7 mm et pour *O. p. porcinus* 6,8-16 x 4,5-11 mm. Le nombre de stries sur le labium antérieur de la vulve était en moyenne 20 et sur le labium postérieur d'environ 25, nombres qui sont proches de ceux indiqués par Walton (respectivement 17 et 20 pour *O. p. domesticus*).

Toutefois, ces tiques ne semblaient pas posséder tous les caractères morphologiques d'*O. p. domesticus* classiquement connu en Afrique mais elles partagent certains caractères avec *O. p. porcinus*, à savoir la présence d'une seule soie latérale apicale du fémur, de longs tarses sur la paire de pattes I, de petites bosses dorsales sur les tarses séparées par plus d'une largeur de

bosse. Le seul caractère que Uilenberg a examiné et qui ne correspondait pas à l'espèce *O. porcinus* était l'existence d'une bosse dorsale apicale sur le métatarse I, ceci pouvant être un développement dû à l'isolement géographique d'un spécimen d'*O. p. domesticus*, qui, d'après Walton, a quelquefois l'apex des métatarses gonflé (Uilenberg, 1963).

Par ailleurs, aucun ancien spécimen d'*O. moubata* récolté historiquement dans les habitations humaines en rapport avec les foyers de fièvre récurrente humaine à Madagascar n'a été conservé, pour permettre la comparaison avec ceux récoltés plus tard dans les porcheries. Depuis cette étude, aucune autre collecte et analyse phylogénique n'avait été réalisée.

2.3.3. Association au virus de la PPA

Aucune étude n'a été réalisée auparavant pour détecter l'infection naturelle d'*O. porcinus spp* des porcheries malgaches par le virus de la PPA mais son association étroite avec les porcs domestiques et certains foyers de PPA a suggéré que cette tique jouait un rôle dans le maintien de la PPA à Madagascar (Roger et al, 2001).

La recherche effectuée par l'équipe de Roger en 2000 (Roger et al, 2001) a montré la présence de ces tiques molles dans trois sites des Hautes Terres malgaches. Le premier site était localisé dans la zone périurbaine de la capitale où les tiques ont été collectées dans une porcherie vide, sous une habitation humaine. Elles ont été facilement détectées puisqu'ils semblaient rechercher activement un hôte bien qu'elles aient pu naturellement se gorger sur des humains et probablement d'autres hôtes comme les porcs, puisque la PPA avait tué beaucoup de porcs en septembre 1998. Le deuxième site était localisé au sud de Tsinjoarivo, dans la province d'Antananarivo, mais la porcherie où le propriétaire a collecté les tiques molles a été détruite par le feu. Le dernier site était une porcherie de Mahitsy. Cependant à cette époque, on ne savait pas si ces tiques existaient déjà depuis longtemps dans cette porcherie sans être détectées, ou s'il s'agissait d'une nouvelle répartition géographique des tiques molles à Madagascar.

Dans tous les cas, la présence de ce réservoir de virus de PPA sur les Hautes Terres où l'élevage porcin est important constitue un danger, et ce d'autant plus que le virus peut persister dans les tiques molles *O. porcinus* pendant de longues périodes et être également transmis dans la population de tiques par les voies sexuelle et transovarienne (Plowright et al, 1969, 1970, 1974; Hess et al, 1989; Kleiboeker et al, 1998). En outre, la tique peut survivre pendant des années sans se nourrir (Walton, 1964).

**DEUXIEME PARTIE : ETUDE DES RÔLES DES
HÔTES SAUVAGES DANS L'EPIDEMIOLOGIE
DE LA PPA**

Chapitre 1 : Les zones d'étude

Les zones d'étude (Figure 22) ont été choisies selon les différences de leur écologie et de leur écosystème. Toutefois, elles partagent la même caractéristique essentielle pour l'étude du cycle sauvage de la PPA : elles correspondent à des zones d'interface présentant une production porcine importante ; elles renferment des foyers de PPA régulièrement rapportés, avec une incidence estimée de 15,2% à 42,5% selon les zones (**Costard, communication personnelle**) ; elles présentent de façon suspectée et/ou confirmée des réservoirs sauvages (tiques et/ou potamochères).

Les différents degrés d'interface (ou d'interaction) entre les cycles domestiques et sauvages permettent de tester plusieurs hypothèses quant aux contacts entre les potamochères, les porcs domestiques et les tiques molles du genre *Ornithodoros*. Les zones de production porcine et avec un nombre conséquent d'élevages sont des zones à forte anthropisation où il existe généralement peu de faune sauvage. Toutefois en milieu domestique, la présence de tiques en contact direct avec les porcs est tout à fait possible. En revanche dans les zones de chasse, les potamochères peuvent entrer facilement en contact avec les porcs domestiques, d'autant plus que ces derniers sont souvent en divagation dans ces sites où l'élevage porcin est plutôt traditionnel. Cependant, ces zones de chasse ne constituent pas des zones de production porcine intensive, d'où des densités de porcs domestiques généralement faibles. De plus, les élevages peuvent être parfois assez éloignés des zones de chasse (environ 10 à 15 km).



Figure 22 : Les trois zones d'étude
 (Zone de Marovoay, zone d'Ambatondrazaka et zone d'Antananarivo dont
 Arivonimamo et Mahitsy)

1. La zone de Marovoay (Plan régional de développement, 2004, Région de Boeny)

1.1. Localisation

Appartenant à la région de Boeny, cette zone est située à 600 km de la capitale, sur la côte nord-ouest de Madagascar (Figure 22), et s'étend sur une superficie de 29 830 km².

1.2. Relief, hydrographie et pédologie

Le relief du Boeny est relativement varié. Sur la zone littorale s'étendent de vastes plaines fertiles longeant les grands fleuves et la côte, comme la grande plaine rizicole de Marovoay. Ailleurs, il existe des zones sablo-gréseuses constituant une transition entre les plateaux et le baiboho (sol humide et inondé pendant la saison de pluie).

Le réseau hydrographique de la région est particulièrement dense. Les trois fleuves principaux de la région sont la Betsiboka, la Mahavavy et la Mahajamba. Ce réseau fluvial est complété par la présence de grands lacs, tarissables ou permanents, avec des plans d'eau favorables à la pêche. Le lac Kinkony est ainsi le deuxième lac de Madagascar après le lac Alaotra.

Les sols de la région ont une origine ferrugineuse tropicale et se répartissent en trois grands types : les sols des tanety latéritiques rouges, les sols hydromorphes des bas-fonds et des plaines, le baiboho sur les berges des fleuves.

1.3. Climat et végétation

Le climat de la région est de type tropical, sec et chaud d'avril à octobre et pluvieux d'octobre à avril, avec une moyenne de précipitations annuelles de 1000 à 1500mm. La température moyenne est de 27°C. Dans ces conditions, la végétation est très diversifiée, avec des mangroves, des forêts denses sèches réputées pour leurs essences nobles, des forêts ombrophiles, des savanes et des formations marécageuses.

1.4. Agriculture et élevage

Dans 33 communes sur 43, la riziculture occupe la première place agricole, suivie par la culture du manioc, du maïs et de la canne à sucre. La commune de Marovoay représente le deuxième grenier à riz de Madagascar après la région d'Ambatondrazaka. Trois cycles de culture du riz ont lieu chaque année. Des cultures de tomate, de concombre et d'anacarde sont

également pratiquées à Mahajanga. Le district d'Ambato-Boeny est reconnu pour les cultures de rente constituées essentiellement d'arachide, de coton et de tabac.

La région de Boeny est aussi une importante zone d'élevage de bovins de race locale. Le nombre de têtes était estimé à 419 582 en 2003. Le recensement effectué cette même année a permis d'estimer l'effectif d'ovins et de caprins à 13 706 et celui des porcs à 12 574.

La répartition du cheptel porcin est relativement homogène entre les districts bien que, pour des raisons culturelles, l'élevage porcin ne soit pas pratiqué à certains endroits. La couverture vaccinale chez les porcs est de 12,6% pour la maladie de Teschen et de 6,1% pour la peste porcine classique (**MPE, 2003**), ce qui suggère des modes d'élevage plutôt traditionnels peu tournés vers la prophylaxie et le contrôle. La majorité des abattoirs fonctionnels sont en réalité de simples tueries ne respectant pas les normes d'hygiène requises. L'élevage de porcs, de volailles, d'ovins et de caprins représente la plupart du temps une activité d'appoint aux activités agricoles, permettant une augmentation des revenus lors des périodes de soudure entre deux récoltes et lors des fêtes familiales ou culturelles. Les contraintes au développement de l'élevage sont nombreuses dans la région : manque d'infrastructure et d'encadrement, tarissement des points d'eau en saison sèche, insécurité rurale.

Dans la zone autour de Marovoay, l'effectif total des éleveurs de porcs recensés en 2006 est de 240 (**MPE, 2006**). La majorité des éleveurs interrogés ont débuté ou redémarré leur activité après l'épizootie de PPA de 1998, en particulier au cours des années 2003 et 2004. Une grande partie de leurs porcs, en majorité des métis (68,2%), sont maintenus en claustration permanente (91,2%) (**Humbert, 2007**).

D'après les enquêtes menées en 2005 par la MPE, la proportion d'éleveurs interrogés ayant déjà suspecté la PPA dans leur élevage est de 15,2%. Les premières suspicions de PPA remontent à 1998, année d'introduction de la maladie sur l'île. En 1999, aucun des éleveurs interrogés n'a déclaré de suspicion de PPA. Entre 2000 et 2004, un nombre assez constant d'éleveurs déclarent avoir suspecté la PPA dans leur élevage. En revanche, il existe un pic important de suspicions au cours de l'année 2005 (**MPE, 2006**).

1.5. Présence de potamochères et de tiques molles

La sous-espèce de potamochère qui se trouve dans cette zone est le *Potamochoerus larvatus larvatus* (**Grubb, 1993**). Le climat et la végétation de cette zone permettent à la population de potamochères de se développer en abondance. La densité est plus importante dans les

zones forestières qui constituent leur habitat idéal, et en particulier dans les aires protégées de la zone d'Ankarafantsika. Dans la région Boeny, le commerce de viande de potamochère représente un complément non négligeable pour l'économie familiale. Cette situation s'est particulièrement accentuée avec l'apparition de la PPA qui a décimé une partie très importante du cheptel porcin domestique. Ainsi, la viande de porc étant rare dans la région, la demande semble s'être réorientée vers la viande de potamochère.

La présence d'*O. porcinus spp* a été signalée sur la côte occidentale de Mahajanga et à Morondava depuis le XVIIIème siècle par **Drury** et confirmée par plusieurs auteurs durant la première moitié du XXème siècle (**Lamoureux 1913; Sudley 1916 ; Poisson 1927 ; Le Gall 1943 ; Néel et al. 1949 ; Colas-Belcour et Néel 1952**). Cependant, de plus récentes investigations ont suggéré sa quasi-disparition depuis les années 1950, au moins à Soalala et dans la zone de Mahajanga (**Rodhain et Fontenille 1988, Roger et al. 2001**).

Nous signalons que la zone qui a été choisie pour l'étude des potamochères est seulement la zone de Marovoay (Figure 23).

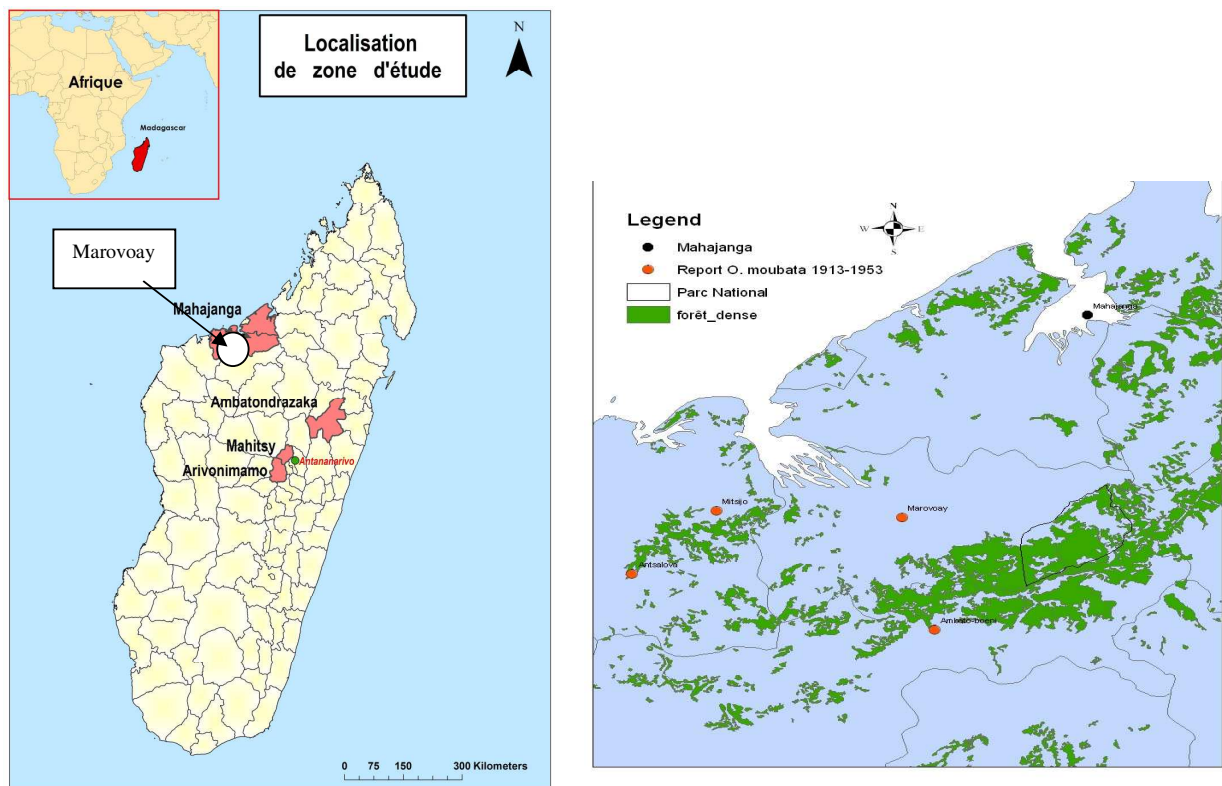


Figure 23 : Zone de Marovoay choisie pour l'étude des potamochères

2. La zone d'Ambatondrazaka (Plan régional de développement 2004, Région d'Alaotra Mangoro, 2005)

2.1. Localisation

Elle appartient à la région d'Alaotra Mangoro de la Province de Toamasina. Elle est située à 200 km au nord-est de la capitale (Figure 22). Elle s'étend sur les deux rives du lac Alaotra, dans sa partie sud, avec pour limites au nord Imerimandroso pour la rive Est et Ambohitrarivo pour la rive Ouest. Elle est à cheval sur 2 sous-préfectures : Ambatondrazaka pour les localités de la rive Est du lac, et Amparafaravola pour les localités de la rive Ouest. Il s'agit

d'une zone très enclavée en raison de l'état des pistes qui y conduisent. L'accès peut être bloqué pendant plusieurs semaines au cours de la saison des pluies.

2.2. Relief, hydrographie et pédologie

La cuvette d'Ambatondrazaka est un vaste plateau d'une altitude moyenne de 700 m. Au milieu de cette cuvette se trouve le lac Alaotra, qui constitue la plus vaste étendue d'eau douce de Madagascar. Il est bordé de marais et de plaines, aux sols propices à la riziculture et aux multiples cultures vivrières.

Des massifs latéritiques forment les abords des bassins versants. Ils sont le siège d'importants phénomènes d'érosion qui sont à l'origine de la formation de Lavaka. Ils représentent les conséquences de la dégradation de la roche mère, aggravée par des techniques culturales non appropriées telles que le surpâturage et la déforestation. Ils montrent de vastes déchirures ayant pour conséquence l'ensablement des rizières.

Les *tanety* sont de petites collines qui bordent le lac. Certaines sont cultivées. D'autres sont des lieux de pâturage pour les ruminants.

2.3. Climat et végétation

Le climat est de type tropical semi-humide, avec une température moyenne comprise entre 21 et 22°C et une pluviométrie de 1500 mm par an. Cette zone est moins froide que les Hauts Plateaux. Il existe deux saisons bien marquées : une saison fraîche et relativement sèche avec quelques pluies fines d'avril à septembre et une saison chaude et pluvieuse d'octobre à mars.

La végétation présente les mêmes aspects que celle des Hautes Terres, avec toutefois des espèces plus tropicales. Une forêt dense et humide se trouve à Didy, une commune située à 50 km de la ville d'Ambatondrazaka.

2.4. Agriculture

La riziculture est l'activité dominante dans la région du lac Alaotra, qualifiée souvent de « Grenier à riz de Madagascar ». Elle compte en effet près de 120 000 hectares de rizières pour une production annuelle de paddy de 300 000 tonnes. Ces rendements demeurent cependant faibles par rapport à ceux des pays asiatiques à cause d'une mauvaise irrigation et de l'ensablement des rizières. La culture du riz rythme la vie dans la région. Toutefois, cette région est également propice à d'autres cultures vivrières : manioc, maïs, arachide, fruits et légumes, canne à sucre...

2.5. Pisciculture et élevage

La pêche traditionnelle constitue une activité importante pour la population riveraine du lac. Les espèces pêchées sont essentiellement la carpe royale et le tilapia. Le développement de cette activité est actuellement menacé par beaucoup de facteurs: l'ensablement du lac, sa pollution par les engrais et pesticides issus de l'agriculture, le non-respect de la taille des mailles de filet. La pisciculture est actuellement en développement dans cette zone.

Dans la plaine du lac Alaotra, l'élevage bovin est essentiellement extensif et surtout destiné à la traction animale, nécessaire aux travaux agricoles. La filière laitière est peu répandue. D'après le recensement effectué en 2005 à Ambatondrazaka par le Service Régional d'Appui à la Production Animale (**SRAPAN Ambatondrazaka, 2005**), l'effectif des bovins est de 91 903 têtes. Les volailles représentent 545 478 têtes, les ovins 17 051 têtes et les porcs 11 109 têtes. Les cheptels de petits ruminants ont considérablement augmentés depuis l'arrivée de la PPA car les éleveurs trouvent que cette filière est « moins à risque » que la filière porcine (**Nzietchung, 2005**).

Dans cette région, la filière porcine a été profondément affectée par l'arrivée de la PPA en décembre 1998. De 1998 à 1999, le cheptel porcin est passé de 28 580 à 5 502 têtes, soit une baisse de 80% dans les préfectures d'Ambatondrazaka et d'Amparafaravola. Cependant, depuis 2003, une croissance progressive du cheptel est observée (**SRAPAN Ambatondrazaka, 2005**). Certains éleveurs acceptent de reprendre le risque de produire des porcs mais gardent des élevages en grande majorité familiaux et traditionnels (**MPE, 2006**). Ainsi en 2006, le nombre total d'élevages porcins recensés autour d'Ambatondrazaka s'élève à 321, chaque éleveur possédant en moyenne 3 à 4 porcs (**MPE, 2006**). Dans les Fokontany (ensemble des quartiers) situés à proximité du chef-lieu de commune, les élevages sont de type fermé avec claustration permanente des animaux. A l'inverse, dans les Fokontany plus reculés (non accessibles par la route nationale) et dans les Fokontany situés au bord du lac Alaotra, la pratique de la divagation est très répandue (**Franco, 2007**).

En 2006, les enquêtes réalisées par la MPE ont estimé à 42,5% la proportion d'éleveurs déclarant avoir eu au moins un foyer de la PPA les années précédentes (**MPE 2006**). Une étude menée en 2004 sur la prévalence de la maladie chez des porcs amenés à l'abattoir a montré un taux de prévalence d'infection variant de 14% à 18% (**Randriamparany et al, 2004**).

2.6. Présence de potamochères et de tiques molles

Dans cette zone, les potamochères appartiennent à la sous-espèce *Potamochoerus larvatus hova* (Grubb, 1993). La population de potamochères est essentiellement concentrée dans la forêt de Didy. Par contre, aucune étude n'a jusqu'à présent signalé la présence de tiques molles dans cette zone.

3. La zone d'Arivonimamo (Plan régional de développement, 2004, Région d'Itasy)

3.1. Localisation

Cette zone appartient à la Région d'Itasy dans la province d'Antananarivo. Elle se trouve dans les Hauts Plateaux, à 50 km à l'Ouest d'Antananarivo (Figure 22).

3.2. Relief, hydrographie, pédologie et végétation

La région d'Itasy, d'environ 6.570 km², correspondant à la crête de l'Ankaratra, s'abaisse progressivement en une longue croupe allongée, suivie par des rivières qui découpent la terminaison des plateaux basaltiques du district d'Arivonimamo.

La région d'Itasy se caractérise par sa richesse en lacs. La région bénéficie d'un réseau lacustre de 3500 ha possédant 51 unités, dont 2 pour la zone d'Arivonimamo. Ces plans d'eau naturels correspondent à d'anciens cratères de volcans.

Les sols néo-volcaniques de la zone sont favorables aux cultures de rente (café arabica, letchi, avocatier, pêcher, pomme de terre, blé, plantes protéagineuses, jatropha, riz pluvial, maïs, tomate, etc....) et s'intercalent de sols ferralitiques couvrant aussi une grande partie de la région. Les sols ferralitiques sont d'évolution très diverse, allant des argiles latéritiques, relativement fertiles, jusqu'aux cuirasses des Tampoketsa, imperméables, dépouillées d'éléments utiles, crevassées de «lavaka ». Dans l'ensemble ces sols sont compacts, fragiles, difficiles à travailler. Néanmoins, convenablement amendés, ils sont favorables à la culture de maïs et de manioc, et peuvent se prêter à la culture de pommes de terre et à l'arboriculture.

3.3. Climat

Le climat de cette région est caractérisé par la présence d'une saison de pluie du mois d'octobre au mois de février avec une précipitation annuelle oscillant en moyenne entre 800mm et 1 000mm et une température moyenne de 26,7°C. Il existe une saison froide et

sèche bien marquée du mois d'avril au mois de septembre avec une température moyenne de 7,1°C.

3.4. Agriculture et élevage

Dans la zone d'Arivonimamo, l'agriculture est basée sur la riziculture. Toutefois, les paysans cultivent aussi du manioc, du maïs, de la pomme de terre, de la canne à sucre, des plantes à huiles essentielles et des cultures maraîchères.

Dans la Région Itasy, l'effectif de bovins se chiffrait à 194 124 têtes en 2003, avec plus de 8 000 têtes pour la seule commune d'Ambohipandrano au sein du district d'Arivonimamo. Les élevages dans les districts de Miarinarivo et de Soavinandriana sont essentiellement à vocation pastorale et adoptent le système d'élevage extensif. Le reste de la région est une zone d'élevage semi-extensif où les animaux sont élevés pour la production du fumier et la traction de matériel agricole. L'élevage laitier se développe également dans la région avec une prédominance notable au sein de la commune d'Arivonimamo I (1 015 vaches laitières), suivie par celle de Miarinarivo II (140 vaches laitières), et d'Arivonimamo II et d'Imerintsiatosika avec respectivement 22 et 23 vaches laitières. Il faut noter aussi la présence d'aviculture (effectif non connu) dans la zone et de pisciculture qui occupe une place importante. En outre, la pêche aide à améliorer l'alimentation de la population et lui procure en même temps un appoint monétaire. L'élevage porcin est répandu dans l'ensemble de la région avec toutefois une certaine concentration dans les localités situées aux alentours des villes: 5 950 têtes pour Miarinarivo II, 5 000 têtes pour Ambatomanjaka, 4 000 têtes au sein de la ville de Miarinarivo et 3 450 têtes à Arivonimamo. Dans la zone d'Arivonimamo, le nombre total d'élevages porcins recensés en 2005 est de 293. Le système est semi-intensif. Les animaux sont généralement parqués de façon permanente (62,8% de claustration pour la zone d'Arivonimamo) (**MPE 2005**) et les produits de l'agriculture servent à leur alimentation. La production porcine se répartie essentiellement entre des races améliorées (44%) d'intérêt commercial et des races locales (54,3%) destinée aux petits éleveurs. Des épizooties de PPA surviennent régulièrement, avec des foyers annuels entre 1999 et 2001 (indice fourni par le programme ILO, un programme intitulé « agriculture et pauvreté à Madagascar », programme en collaboration avec le FOFIFA). Dans la zone d'Arivonimamo, 36,8% des éleveurs enquêtés ont déclaré avoir eu au moins un foyer de PPA dans leurs élevages depuis 1999 (**MPE 2005**).

3.5. Présence de potamochères et de tiques molles

Les potamochères sont absents dans cette zone de production porcine intensive. Ceci est dû principalement au manque d'habitat approprié ainsi qu'à la densité élevée de population humaine dans cette zone.

Bien que l'altitude soit habituellement considérée comme peu favorable à la présence des tiques ornithodores (**Morel, 1969**), des spécimens des espèces d'*O. porcinus* ont été trouvés pendant les années 1980 à Mahasolo, à 150km d'Antananarivo (**Uilenberg et Hoogstraal 1979, Rodhain et Fontenille 1989**), et en 2000 à Mahitsy, Andralanitra et Tsinjoarivo, respectivement dans les banlieues d'Antananarivo et au sud vers Antsirabe (**Roger et al, 2001**).

Ci-dessous le tableau résumant la situation épidémiologique de la PPA dans les zones d'étude.

Tableau 1 : Situation épidémiologique de la PPA dans les trois zones d'étude

| | Marovoay | Ambatondrazaka | Arivonimamo |
|--|--|--|--|
| Présence de tiques molles ornithodores | OUI (dans les années 60) | NON (présence non signalée jusqu'à présent) | OUI (dans les années 80) |
| Présence de potamochères | OUI | OUI | NON |
| Présence de Porcs domestiques | OUI (dont la plupart de type traditionnel et en claustration permanente) | OUI (dont la plupart de type traditionnel et en claustration permanente) | OUI (dont la plupart de type traditionnel et en claustration permanente) |
| Foyers confirmés de PPA | OUI | OUI | OUI |

Zone de référence pour la présence de tiques: Mahitsy

En dehors des trois zones d'étude sélectionnées par le projet, nous avons choisi Mahitsy comme zone de référence pour la présence de tiques molles du genre *Ornithodoros*. En effet, des spécimens d'*O. porcinus* y ont été collectées en 2000 par l'équipe de François ROGER (Roger et al, 2001). Cette commune est située à 25 km au nord-ouest d'Antananarivo, sur les Hauts plateaux. Elle présente un climat chaud et humide pendant la saison des pluies et un climat sec et froid pendant la saison sèche. Elle possède de nombreux élevages porcins de type traditionnel et de type semi-moderne. Cette région a connu beaucoup de dégâts à cause de la PPA depuis 1999. Comme à Arivonimamo, les potamochères sont absents de cette zone à cause de la forte densité de la population humaine.

Compte tenu de la proximité géographique de Mahitsy et d'Arivonimamo avec Antananarivo, ainsi que de leurs caractéristiques climatiques communes et de la similarité des bâtiments d'élevage porcin dans ces zones, Mahitsy et Arivonimamo ont été considérées pour les besoins de l'étude comme partie intéressante de la grande zone d'Antananarivo.

Chapitre 2 : Etude du rôle des tiques molles **ornithodores dans l'épidémiologie de la PPA à** **Madagascar**

1. Objectifs

O. porcinus spp est connue à Madagascar depuis le début de XXème siècle comme vecteur de la fièvre récurrente humaine dans la zone ouest du pays (cf. chapitre I.1.5). En 2000, pendant l'épizootie de la PPA, cette tique a été retrouvée dans une porcherie à Mahitsy, dans la zone des Hauts-Plateaux, et les auteurs ont supposé qu'elle pouvait entrer en contact avec les porcs domestiques potentiellement infectés par le virus de la PPA et ainsi jouer le rôle de réservoir de virus pour son maintien sous forme enzootique, comme c'est le cas en Afrique (**Plowright et al, 1969**). Toutefois, aucune étude supplémentaire n'avait à ce jour permis de réellement mettre en évidence leur rôle dans l'épidémiologie de la PPA à Madagascar.

L'étude présentée ici a donc pour objectif de confirmer la présence d'*O. porcinus spp* dans les porcheries malgaches, d'identifier les facteurs favorisant sa présence au niveau local et national, de préciser sa systématique – entre autre sa relation phylogénétique avec les autres espèces et sous-espèces africaines -, et de détecter si possible l'infection naturelle de ces tiques par le virus de la PPA afin de confirmer leur implication dans l'épidémiologie de la PPA à Madagascar.

2. Matériel et méthode

L'étude a été effectuée de 2006 à 2008. La plupart des travaux de terrain a été conduite de juillet à décembre 2006, pendant la saison sèche, pour faciliter l'accession aux zones d'étude. Quelques prélèvements complémentaires ont été réalisés en juillet et août 2007 et en juin 2008, à la même saison pour permettre la comparaison des résultats.

2.1. La collecte de données

2.1.1. Collecte de tiques dans les porcheries

2.1.1.1. Echantillonnage

Le terme « élevage » ou « porcherie » ou « ferme » a été défini comme toute entité appartenant à un même éleveur et a été utilisée dans cette étude comme « unité » d'échantillonnage. Cette entité peut être constituée de plusieurs bâtiments mais dans ce cas, les pratiques d'élevage y sont généralement communes (traitements, prophylaxie, alimentation...).

Les résultats disponibles ont montré la faible présence et l'hétérogénéité de la tique *O. porcinus spp* à Madagascar, ainsi deux approches ont été adoptées pour la détection de tiques dans les porcheries :

- a) Echantillonnage ciblé sélectionnant en priorité les fermes fortement suspectées d'être infestées par la tique (**Williams, 2009**) sur la base de précédentes études confirmant la présence de tiques dans des porcheries, ou sur des résultats positifs en ELISA anti-tique sur des sérums de porcs domestiques collectés en 2006 et ré-analysés pour l'étude (**Canals, 1990**) : quand la présence d'*O. porcinus spp* était confirmée par l'échantillonnage ciblé, des études ont alors été conduites autour des fermes infestées, afin d'évaluer les modes de distribution locale de ces tiques et de déterminer la prévalence d'infestation des porcheries.
- b) Echantillonnage aléatoire stratifié par village lorsque la détection d'*O. porcinus spp* ne peut être prédite par des études antérieures ou des méthodes indirectes de détection, pour confirmer ou infirmer l'absence de cette tique dans la zone étudiée : la taille de l'échantillon, c'est-à-dire le nombre de fermes à examiner dans chaque village dans chaque zone d'étude, a été déterminée en utilisant le module « détection de la maladie » dans le logiciel WINEPISCOPE 2.0 (<http://www.clive.ed.ac.uk/winepiscope>) d'après le nombre total estimé de fermes dans chaque village sélectionné et le nombre estimé de fermes pouvant être infestées par la tique *O. porcinus spp*, avec un intervalle de confiance de 95%. Les villages examinés pour la présence de tiques ont été choisis à partir d'un recensement préliminaire des fermes réalisé en 2006 dans les trois zones d'étude (**MPE, 2006**) et ont été répartis de manière homogène pour chaque zone d'étude. Les études effectuées sur les tiques ornithodores dans les fermes espagnoles et africaines (**Oleaga-Perez 1990, Haresnape & Mamu 1986**) ont permis de choisir comme référence, un taux d'infestation estimé de 30%.

2.1.1.2.Méthodes de collecte (Voir Annexe 9)

Dans chaque bâtiment d'une porcherie, ont été examinées (i) les fissures et trous présents au sol autour du bâtiment et à l'intérieur, (ii) la litière du bâtiment (sable, paille, plancher en bois, terre battue...), (iii) les fissures, crevasses, enduit et autres anfractuosités des murs intérieurs du bâtiment, (iv) les poteaux en bois entourant parfois les bâtiments, (v) le toit du bâtiment (charpente en bois, paille recouvrant la charpente...) (fiche en annexe 4). Par précaution, nos chaussures, nos vêtements et le matériel de collecte (aspirateur, pelle et plateau) ont été systématiquement nettoyés à l'aide de détergents entre chaque élevage.

Deux méthodes différentes ont été utilisées pour la collecte de tiques: (i) la collecte manuelle en utilisant une petite pelle pour rassembler les poussières et débris des crevasses et autres anfractuosités, et (ii) la collecte par aspiration lorsque certaines crevasses plus profondes étaient inaccessibles à la main, à l'aide d'un aspirateur à essence, portatif, à moteur, originellement conçu pour aspirer des feuilles et adapté pour l'aspiration de la litière et de la poussière dans les anfractuosités des terriers colonisés par des tiques endophiles (**Butler, 1982**), (Figure 24).

La poussière collectée était ensuite versée dans un plateau blanc et exposé au soleil pour extraire les tiques molles *O. porcinus spp* qui sont des espèces photophobes (**Morel 1969**), (Figure 25).

Les deux techniques ont permis de rassembler des tiques vivantes de différents stades, alimentés ou à jeun.



Figure 24 : Aspirateur à feuille adapté pour la collecte des tiques molles



Figure 25 : Plateau blanc pour collecter les débris et les poussières, pouvant contenir des tiques molles

2.1.1.3. Mode de conservation des tiques

Les tiques récoltées ont été placées dans des tubes dont le couvercle était troué afin que l'air puisse entrer. Chaque tube contenait un morceau humide de papier filtre pour maintenir une hygrométrie appropriée à la survie des tiques. Ces dernières ont ensuite été élevées au laboratoire du DRZV /FOFIFA en plaçant les tubes dans un dessiccateur contenant dans son fond de la solution de l'hydroxyde de potassium (KOH) à saturation pour maintenir une humidité environ de 92%. Ce dessiccateur a été déposé dans une étuve à une température de 20 à 25°C.

Seules quelques tiques ont ainsi été maintenues en élevage tandis que la majorité ont été tuées et stockées à -80°C (selon le protocole du projet, voir Annexe 13) dans un tube Eppendorf de 1,8 ml (10 tiques / tube) avant leur envoi au laboratoire de virologie du CIRAD Baillarguet à Montpellier pour analyse.

2.1.2. Description de la structure et des traitements réalisés dans les bâtiments d'élevage

Afin de comprendre la distribution d'*O. porcinus* à Madagascar, un questionnaire (en annexe 4) a été complété pour chaque ferme examinée. Ce questionnaire comprenait une description complète des structures de la porcherie, incluant le nombre de bâtiments et le type de bâtiment dont la nature du sol, de la litière, des murs ou des clôtures, du toit et de la charpente. La pratique d'élevage (les types d'élevage et de claustration, les effectifs, les races, la prophylaxie effectuée) ainsi que des mouvements de porcs en termes d'échange, de vente, d'achat ou de saillie naturelle étaient indiqués. Les modes de traitement (ou la désinfection) habituels des bâtiments de la porcherie ont été mentionnés. Le résultat de recherche de tiques dans toutes les parties du bâtiment examiné a été aussi indiqué dans ce questionnaire.

En vue de détailler les traitements des bâtiments par les éleveurs, une étude satellite a également été conduite en 2008 dans le village d'Arivonimamo. Ce questionnaire indiquait le type de traitement, le nom et l'origine des produits et les causes de traitement.

2.2. Les analyses des échantillons et des données

Nous avons effectués toutes les analyses sérologiques au laboratoire CISA/INIA à Madrid et au laboratoire IRNASA à Salamanque, Espagne ; et toutes les analyses virologiques au laboratoire de virologie, UMR 15, CIRAD Baillarguet à Montpellier.

2.2.1. Test sérologique des sérums de porcs domestiques

Des aliquotes des sérums de porc prélevés en 2006 dans les trois zones d'étude ont été envoyées au laboratoire IRNASA (Instituto de Recursos Naturales Y Agrobiologia) à Salamanque (Espagne) et ont été analysées en vue de la détection des anticorps anti-tiques en utilisant des antigènes des glandes salivaires spécifiques aux espèces d'*O. moubata*.

Le test ELISA anti-tique utilisé a été développé par Canals en 1990 (**Canals et al, 1990**) pour détecter l'anticorps anti-glande salivaire de la tique *Ornithodoros* se trouvant dans le sérum des porcs et des potamochères. Il s'agit d'un outil permettant de déterminer si des tiques se sont gorgées sur l'animal et de détecter s'il y a des tiques dans les lieux où vivent le porc ou le potamochère (**Pérez Sanchez et al, 1992**) et (**Oleaga-Pérez et al, 1994**).

Initialement développé pour *O. erraticus* en Espagne et utilisant des extraits bruts de glandes salivaires de tiques comme antigène (**Canals et al, 1990**), le test a ensuite été modifié. Sa

spécificité a été améliorée par le choix de la partie soluble d'extraits de glandes salivaires (Saliva gland Extract) SGE-2, qui est exempte d'antigènes embrouillants dérivés des tissus glandulaires (**Pérez-Sanchez et al, 1992**). L'antigène SGE-2 est spécifiquement adapté à la tique *O. moubata* (**Baranda et al, 1997**).

L'antigène utilisé dans cette étude était l'extrait des glandes salivaires SGE-2 de l'*Ornithodoros moubata* (**Baranda et al, 1997**). Les tiques *Ornithodoros moubata* ont été fournies par le laboratoire IAH de Pirbright (Londres) et l'extraction de leurs glandes salivaires a été réalisée lors de notre analyse au laboratoire de Salamanque en Espagne.

a) Extraction des glandes salivaires des tiques molles *O.moubata*

Après une dissection des tiques adultes sous microscope binoculaire, l'emplacement des glandes salivaires a été repéré (Figure 26). Cinquante paires de ces glandes, ayant une forme tubulaire et de couleur blanchâtre (Figure 27) ont été extraites et mises dans une solution saline tamponnée aux phosphates (PBS : Phosphate Buffered Saline) de pH=7,4 à +4°C. Elles ont été ensuite rincées trois fois avec de la solution de PBS. Suspendues dans 2 ml de PBS, elles ont été congelées à -20°C et décongelées cinq fois avant d'être centrifugées à 1000 rpm pendant 30 minutes. Le surnageant a été récupéré et filtré à l'aide d'un filtre de 0,2 µm. Le produit filtré est appelé extrait de glande salivaire ou SGE qui a été servi comme antigène. La concentration des protéines a été ensuite mesurée par la méthode de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).



Figure 26: Tique coupée dans la partie supérieure montrant l'emplacement des glandes salivaires



Figure 27 : Glandes salivaires en formes de tubules blancs détachés

b) Procédure du test ELISA utilisé

Le test ELISA indirect a été réalisé selon la méthode de Canals en 1990. La microplaque a été en premier lieu sensibilisée, chaque cupule recevant 100 µl d'antigène SGE-2 dilué à 1/100 avec une solution de carbonate (Na_2CO_3 15mM, NaHCO_3 34mM, pH= 9,6).

La microplaque a été ensuite incubée à 4°C toute la nuit ou à 37°C pendant une heure puis lavée 3 fois avec une solution de lavage constituée d'une solution de PBS et de 0,05% Tween 20. La saturation des sites libres a été réalisée par addition dans chaque cupule de 200 µl de solution de PBS contenant 1% de sérum de bovin ou BSA (Bovine Serum Albumin), la microplaque a été ensuite incubée à 37°C pendant une heure. Après le lavage de la microplaque, 100 µl de sérum dilué à 1/50 avec de la solution de PBS Tween 20 et 0,5% BSA, ont été déposés en duplication dans chaque cupule. Après une nouvelle incubation pendant une heure à 37°C, la microplaque a été lavée avant l'addition dans chaque cupule de 100 µl de conjugué anti-porc IgG Peroxydase (Sigma) dilué à 1/6000 avec la solution de PBS Tween 20. Elle a été ensuite incubée à 37°C pendant une heure. Après un nouveau lavage, 100µl de substrat ont été déposés dans chaque cupule. Cette solution de substrat est composée de la solution d'Ortho-Phényle-Diamine (OPD) 30 mg, 50 ml de solution d'acide citrique 25 mM et de Na_2HPO_4 12 H_2O , 24 mM à pH=5 et 20 µl de H_2O_2 à 30%. La réaction a été stoppée en ajoutant 100 µl d'acide sulfurique 3N dans chaque cupule. La lecture de la microplaque a été réalisée avec un spectrophotomètre à 492 nm (EAR 400 FT; SLT Lab. Instruments, Germany). Des sérums de contrôle positifs et négatifs ont été inclus dans chaque microplaque.

c) Méthode utilisée pour l'obtention des sérums de contrôle (positifs et négatifs) et calcul du seuil de positivité du test

Les sérums de contrôle ont été obtenus à partir de porcs infestés expérimentalement avec l'espèce *O. moubata* en laboratoire (**Baranda et al, 2000**). Des animaux ont été infestés trois fois, tous les 15 jours, avec 1000 nymphes de stade 1 (ou N1) ou 50 adultes d'*O. moubata*. Des prises de sang ont été effectuées au temps zéro (pré-infestation) pour les contrôles négatifs ; 7 jours après la première infestation et à 7 et 15 jours après la troisième infestation, pour les contrôles positifs.

Le seuil de positivité du test ELISA indirect peut correspondre aux valeurs de la densité optique des contrôles négatifs additionnées de deux écart-types (**Canals et al, 1990**) ou de

trois écart-types (**Nebreda et al, 2003**). Ainsi, tous les sérums ayant une valeur de densité optique supérieure à cette valeur calculée sont considérés comme positifs.

Dans notre étude, le seuil de positivité du test est calculé selon l'indice sérologique (IS) pour homogénéiser les résultats entre les différentes microplaques ELISA. L'IS a été calculé pour chaque densité optique (DO) obtenue lors du test en utilisant la formule suivante :

$$\frac{[(CN - S) / (CN - CP)] \times 100}{}$$

Où CN et CP représentent respectivement la valeur de DO du contrôle négatif et celle du contrôle positif et S représente la valeur de DO de chaque sérum (**Hernandez-Gonzales et al, 2008**).

Ainsi, les sérums ont été considérés négatifs si la valeur de l'IS était inférieure à 10 et positifs si la valeur de l'IS était supérieure à 30, particulièrement pour les valeurs de l'IS allant jusqu'à 80. Entre ces deux valeurs de l'IS (10 et 30), les sérums ont été considérés comme douteux.

2.2.2. Analyse moléculaire des tiques

Les spécimens collectés durant l'étude ainsi que quelques-uns de ceux collectés par Roger en 2000, ont été individuellement identifiés selon leurs critères morphologiques lors d'observation à la loupe binoculaire. Leur sexe et leur stade de développement ont été déterminés. Ils ont ensuite été préparés comme suit.

2.2.2.1. Préparation de l'homogénat

Après 3 lavages dans une solution de PBS 1%, un homogénat a été obtenu pour chaque spécimen en écrasant la tique dans 1 ml de MEM (Minimum Essential Medium), (Réf. CM1MEM10-01) additionné de 50 U/ml de pénicilline, streptomycine et amphotéricine B (fungizone) dans un tube Eppendorf 1,5 ml. Les homogénats ont été ensuite soumis à deux séries de congélation-décongélation congelés pour faciliter l'éclatement des cellules et l'accès à l'ADN lors de son extraction. Ils ont par la suite été stockés à -70°C jusqu'au moment de l'extraction d'ADN.

2.2.2.2. Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus afin de mettre en œuvre des méthodes génomiques d'identification de l'organisme en présence. Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN, suivant tous approximativement la même séquence :

- Lyse des cellules
- Elimination des protéines
- Elimination des autres acides nucléiques (ARN)
- Concentration de l'ADN par précipitation dans l'alcool

La tique possède un exosquelette chitineux dur qui doit être éliminé avant l'extraction de son ADN et l'ADN extrait semble être fortement susceptible à la dégradation (**Hill et al, 2003, Hubbard et al, 1995**). Des inhibiteurs de l'enzyme Taq-polymérase peuvent exister également chez la tique (**Schwartz, et al, 1997 ; Hubbard et al, 1995**).

Tous ces facteurs peuvent jouer un rôle en diminuant l'efficacité de l'amplification de l'ADN de la tique. Compte tenu de ces difficultés (**Schwartz et al, 1997**), la méthode choisie pour cette étude est celle utilisant la protéinase K pour la digestion enzymatique et la solution phénol chloroforme pour l'élimination des autres protéines et des autres acides nucléiques (ARN) de l'homogénat (**Halos et al, 2004**).

L'homogénat, stocké à -70°C, a été décongelé et centrifugé pendant 3 minutes à 3000 rpm. Deux cents µl de surnageant ont été récupérés dans un tube Eppendorf de 1,5 ml et mélangé à 300 µl de solution de phénol chloroforme isoamyl alcool saturé avec 10mM de Tris pH=8 et 1mM EDTA (SIGMA). Agité pendant 15 secondes, le tube a ensuite été centrifugé à 13 000 rpm pendant 3 minutes. Les protéines dénaturées ont ainsi formé un précipité à l'interface phénol-eau, tandis que l'ADN est resté en solution dans la phase aqueuse se trouvant dans la partie supérieure. Cette phase aqueuse a été récupérée dans un tube Eppendorf de 1,5 ml et ajustée à 270 µl avec de l'eau stérile, additionnée de 30 µl d'une solution d'Acétate de sodium 3M (0,3M final). L'ADN a été ensuite précipité par ajout de 750 µl de l'éthanol absolu (soit 2,5 fois le volume). Le mélange a été centrifugé à 13 000 rpm pendant 20 minutes et le surnageant jeté. Le culot a été lavé et partiellement hydraté dans 500 µl d'éthanol à 70% puis séché dans un évaporateur pendant 10 minutes. Enfin, l'ADN a été resuspendu dans 20 µl à 50 µl d'eau ultra pure stérile. La quantité d'eau ajoutée a été estimée en fonction de la taille du culot. L'ADN de la tique a ensuite été conservé à -20°C jusqu'au moment de analyse.

2.2.2.3. Amplification d'ADN

L'ADN extrait a pu ensuite être amplifié spécifiquement par la PCR qui permet de détecter plus facilement l'ADN de l'organisme lui-même ou d'un pathogène inclus dans cet organisme.

a) Amplification du fragment d'ADNr 16S de tique

Afin de vérifier l'intégrité de l'ADN extrait et par la même occasion de déterminer l'espèce de tique molle rencontrée à Madagascar, le fragment d'une taille de 475 paires de base de l'ADN ribosomal (ADNr) 16S de chaque tique a été amplifié en utilisant le couple d'amorces suivant, défini spécifiquement pour les tiques appartenant au complexe d'espèces *O. moubata* selon le protocole décrite par Vial en 2006 (**Vial et al, 2006**) :

Tm16S +1 (5'-CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGC-3')

Tm16S -1 (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCATGTA-3').

Composition du mélange PCR (volume final de 25 µl) :

- 5,6 µl de H₂O
- 12,5 µl de solution Master Mix Eppendorf (2,5X)
- 2,5 µl de solution Q (MgCl₂)
- 0,2 µl de solution d'amorce Tm16S-1(10 pmol/µl)
- 0,2 µl de solution d'amorce Tm16S+1 (10 pmol/µl)
- 4 µl d'extrait d'ADN

Programme PCR (dans une machine thermo cycler Applied Bio System):

- Dénaturation de l'ADN double brin : 95°C pendant 15 minutes
- 10 cycles avec :
 - Dénaturation 92°C pendant 1 minute
 - Hybridation 48°C pendant 1 minute 30 secondes
 - Elongation 72°C pendant 1 minute 30 secondes
- 32 cycles avec :
 - Dénaturation 92°C pendant 1 minute
 - Hybridation 54°C pendant 1 minute 30 secondes
 - Elongation 72°C pendant 1 minute 30 secondes
- Elongation finale à 72°C pendant 10 minutes puis conservation à 10°C pendant 10 minutes.

Ce fragment a été révélé par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1,5% (Q-Biogène) en TAE 1 X contenant du bromure d'éthidium ou BET (0,4 µM). Après la solidification du gel, 10 µl de produit d'amplification mélangé à 3 µl de bromophénol ont été déposés dans chaque puits du gel ; une quantité de 5 µl de marqueur, de poids moléculaire 100 pbs, a été aussi déposée sur le côté du gel à titre de référence. La migration a ensuite été réalisée sous une tension de 120 volts pendant 1 heure dans une cuve d'électrophorèse contenant du TAE 1 X.

Les bandes ont enfin été révélées sous rayonnement Ultra-violet à l'aide d'un Bio-imager (Bio-vision).

b) Amplification du gène VP72 du virus de la PPA

Tous les échantillons pour lesquels un résultat positif était obtenu en ADNr 16S ont été testés pour l'infection par le virus de la PPA. Pour se faire, le gène VP72 a été amplifié par PCR nichée ou « Nested PCR » décrite par Basto en 2006, à l'aide de deux couples d'amorces :

72 Ars (5'-GAC GCA ACG TAT CTG GAC AT-3')

72 Aras (5'-TTT CAG GGG TTA CAA ACA GG-3')

72 Ns (5'-TAC TAT CAG CCC CCT CTT GC-3')

72 Nas (5'-AAT GAC TCC TGG GAT AAA CCA T-3')

La protéine VP72 (codée par le gène B646L) est la composante principale de la capside virale qui entoure l'enveloppe interne du virus. La PCR nichée est une PCR par emboîtement où une partie du premier produit de la PCR ou « amplicon » est ensuite elle-même amplifiée par la seconde PCR. Cette méthode permet d'augmenter la sensibilité de détection et est particulièrement recommandée lors de recherche d'infection dans de petits organismes (faible quantité de pathogène).

Première PCR (fragment attendu de 370 paires de bases)

Composition du mélange PCR (volume final de 25 µl) :

- c) 10 µl de solution Master Mix Eppendorf (2,5X)
- d) 5,5 µl d' H₂O stérile
- e) 1 µl de solution d'amorce 72 Ars (10 pmol/µl)
- f) 1 µl de solution d'amorce 72 Aras (10 pmol/µl)
- g) 7,5 µl de solution d'ADN

Programme PCR :

- Dénaturation initiale pendant 7 minutes
- 35 cycles avec :
 - Dénaturation 95°C pendant 30 secondes
 - Hybridation 60°C pendant 30 secondes
 - Elongation 72°C pendant 30 secondes
- Elongation finale à 72°C pendant 10 minutes puis conservation à 10°C pendant 10 minutes.

Seconde PCR (fragment attendu de 243 paires de bases) :

Composition du mélange PCR (volume final de 50 µl) :

- 20 µl de solution Master Mix d'Eppendorf (2,5 X)
- 21 µl d' H₂O stérile
- 4 µl de solution d'amorce 72 Ars (10 pmol/µl)
- 4 µl de solution d'amorce 72 Aras (10 pmol/µl)
- 1 µl de produit d'amplification de la première PCR

Le programme de cette PCR était exactement le même que celui de la première PCR. La révélation du produit final d'amplification a été réalisée de la même manière que pour l'ADNr 16S de tique.

2.2.3. Analyse phylogénétique

Afin de déterminer la relation phylogénétique entre les tiques récoltées et celles connues en Afrique de l'est et australe et confirmer leur infection par le virus de la PPA, quelques produits d'amplification du fragment d'ADNr 16S de tique et du gène VP72 du virus de la PPA ont été directement séquencés à l'aide d'un analyseur ABI PRISM 3730 xl DNA (Cogenix Meylan, France).

Une analyse phylogénétique a ensuite été réalisée par Laurence Vial du CIRAD. Les séquences ont été éditées et alignées manuellement avec Seaview (**Galtier et al, 1996**). Des arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant les méthodes de distance ou « Neighbor-Joining » (NJ), parcimonie (P), et des algorithmes de maximum de vraisemblance (ML) à l'aide du logiciel de Phylip, avec 1000 répétitions ou BootsTraps (BT) et addition aléatoire des séquences (**Felsenstein 1985**). Les délétions ont été traitées comme une cinquième pb. Les séquences du gène VP72 ont été comparées avec la séquence complète de ce gène disponible pour la souche européenne BA71V (M34142 dans GenBank). Pour l'alignement des séquences du fragment d'ADNr16S, la tique molle *Argas persicus* de la sous-famille *Argasinae* a été utilisée comme groupe d'enracinement des arbres (L34321 dans GenBank). Des séquences disponibles du fragment d'ADNr 16S pour des spécimens africains du complexe d'espèces *O. moubata* ont été incluses pour préciser la relation phylogénétique des tiques malgaches avec leurs homologues africains, dont *O. moubata* (L34328 dans GenBank), *O. porcinus porcinus* (L34329 dans GenBank) et *O. porcinus domesticus* (L34330 dans GenBank) publiés par Black en 1994.

2.2.4. Analyse statistique des questionnaires aux éleveurs

La saisie, le codage et la manipulation des données résultant de la description des fermes examinées pour la présence de tiques molles dans les trois zones d'études ainsi que celles provenant des questionnaires sur les traitements des bâtiments et des porcs dans la zone d'Arivonimamo, ont été effectués à l'aide du logiciel Microsoft Access 2003. Les statistiques descriptives ont été réalisées grâce au logiciel statistique XLSTAT-Pro 2008.

Pour les trois zones d'études, les types de bâtiments d'élevage et la nature des soins apportés aux animaux et aux bâtiments ont été analysés à l'aide d'une « Analyse de Correspondance Multiple » ou ACM (Escofier & Pages, 1994). Cette analyse a été réalisée par Laurence Vial du CIRAD dans un but prospectif méthodologique et pour définir les grandes classes de facteurs favorables ou non à l'installation d'*O. porcinus spp.* L'ACM est généralement utilisée en tant qu'extension de l'analyse de correspondance (AC) pour étudier les rapports existant entre plus de deux catégories de variables qualitatives décrivant le même ensemble de données. Le principe d'une telle analyse est de définir des projections ou des facteurs représentant le résumé optimal des rapports entre les catégories de variables. L'ACM est particulièrement utile pour analyser les données de questionnaires basés sur des questions fixes avec des choix multiples. Dans la présente étude, l'ensemble des données a été organisé en 4 groupes de variables actives directement liées à la structure du bâtiment (sol, litière, mur et toit) et en 4 groupes de variables supplémentaires non utilisées pour définir les facteurs, mais fournissant la signification additionnelle à ces facteurs (zone, présence de tique, traitement de bâtiment, traitement de porc).

3. Résultats

3.1. Présence de la tique *O. porcinus spp* dans les porcheries malgaches

3.1.1. Tiques collectées d'après le résultat de l'ELISA anti-tique dans les 3 zones d'étude

Dans les trois zones d'étude, 106 individus (39,1%) ont été trouvés douteux et 3 (1,1%) positifs parmi les 271 sérums porcins analysés par ELISA anti-tique. Tous les échantillons douteux et positifs ont été considérés pour les recherches ultérieures de tiques dans les fermes.

Cependant, 50 de ces échantillons ont dû être omis puisqu'ils provenaient d'abattoirs : par conséquent, l'origine des porcs n'était pas connue. Du fait de la réticence de certains éleveurs à faire visiter leurs porcheries au risque d'une potentielle introduction de PPA, ainsi que de la destruction de bâtiments à la suite d'une épizootie de PPA, il n'a été possible de vérifier la présence de la tique *O. porcinus spp* que dans 35 fermes réparties comme suit : 23 fermes dans la zone de Marovoay ; 9 dans la zone d'Ambatondrazaka et 3 dans la zone d'Arivonimamo-Antananarivo (Tableau 2). Ces fermes ont fourni 33 sérums douteux et 2 positifs.

Dans ces 35 fermes, aucune tique n'a été trouvée.

Tableau 2 : Protocole et résultats de l'échantillonnage pour la recherche des tiques dans les fermes de porcs des trois zones d'étude à Madagascar

| Zones d'étude | Echantillonnage | Taille de l'échantillon | Fermes visitées | Intervalle de confiance | Presence/ Absence tiques | Communes /Villages |
|----------------------|-------------------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|--------------------------|--|
| Antananarivo-Mahitsy | EC ELISA + EC collection en 2000 | 3 2 | 3 2 | | 0 + | Ambohimahandry Mahitsy |
| | EP supplémentaire | - | 3 | | 0 | Mahitsy |
| | EA supplémentaire | 9 Total =9 | 7 Total = 7 | 92% | 0 | Arivonimamo |
| TOTAL | | | 15 | | | |
| Ambaton-drazaka | EC ELISA | 17 | 9 | | 0 | Bejofo, Ambatosoratra Ambohimandroso Ambantondrazaka |
| | EA | 9 | 2 | 50% | 0 | Bejofo |
| | | 9 | 7 | 92% | 0 | Ambatosoratra |
| | | 8 | 5 | 84% | 0 | Ambohimandroso |
| | | 9 Total = 35 | 7 Total = 21 | 92% | 0 | Ambatondrazaka |
| TOTAL | | | 30 | | | |
| Marovoay | EC ELISA | 39 | 23 | | 0 | Marovoay/Ankazomborona Andranofasika, Tsararano |
| | EA | 9 | 9 | 95% | 0 | Marovoay/Ankazomborona |
| | | 9 | 9 | 95% | 0 | Manaratsandry |
| | | 8 | 6 | 90% | 0 | Andranofasika |
| | | 8 Total = 42 | 8 Total = 40 | 95% 95% | 0 | Tsararano Bekobay/Tsilakanina |
| TOTAL | | | 63 | | | |

Ce tableau montre les différents échantillonnages des fermes :

- un premier l'échantillonnage ciblé (EC) basé sur le test ELISA anti-tique et les collections de tiques précédentes
- un échantillonnage aléatoire secondaire (EA) dans les zones où les tiques n'ont pas été trouvées
- un échantillonnage périphérique (EP) qui a été restreint à la zone d'Antananarivo où la présence de tiques a été confirmée.

3.1.2. Tiques collectées d'après les collectes historiques réalisées dans la zone d'Antananarivo

Notre étude a confirmé la présence de tiques molles *O. porcinus spp* (Figure 28) dans une ferme (Figure 29) à Mahitsy dont les coordonnées géographiques sont : 18°45' 3' ' S et 47°20' 47' ' E. Cette ferme est la même que celle qui avait été trouvée infestée par Roger en 2000.

Durant la période d'épizootie de la PPA en 2000, 70 porcheries ont été visitées par l'équipe de Roger pour la recherche des tiques molles Ornithodores : elles sont localisées sur le long de la route nationale allant d'Antananarivo à Mahajanga et autour d'Antananarivo-ville et au sud-ouest d'Antananarivo (Tsinjoarivo). Des tiques molles ont été trouvées dans deux sites : l'un à Mahitsy (30 km d'Antananarivo) dans une porcherie qui a servi également comme habitation humaine (Figure 29), et l'autre à Andralanitra (zone sub-urbaine d'Antananarivo). A Tsinjoarivo, des tiques collectées dans des porcheries ont été ramenées par un éleveur.

Nous avons trouvé également les tiques dans la porcherie à Mahitsy où Roger les avait collectées en 2000. Il s'agit d'un local au rez-de-chaussée, de 10 m² environ et de 2,5 m de hauteur et dont les murs sont en terre battue. Le premier étage du bâtiment sert d'habitation. Le propriétaire élevait de porcs depuis 1987 dans ce local. Cette pièce a également servi pour d'autres éleveurs à partir de l'année 2000 comme lieu de passage provisoire des porcs (jusqu'à plusieurs dizaines) avant leur vente au marché local. Ces porcs pouvaient venir de plusieurs dizaines ou centaines de kilomètres (Maevatanana, Ambohitromby et Fenoarivo Be). Le propriétaire soupçonne les porcs provenant d'Ambohitromby, une zone à 355 km au Nord-Ouest de la capitale, d'être à l'origine de l'infestation des lieux par les tiques. Nous avons pu visiter cette zone au mois de juillet 2008 pour vérifier cette suspicion, mais aucune tique n'a été trouvée dans les cinq porcheries examinées. Il faut cependant noter qu'à Ambohitromby la plupart des porcs sont encore en divagation.

A partir de l'année 2004, le propriétaire de la porcherie à Mahitsy a décidé de ne plus mettre de porcs dans ce local, essentiellement à cause des tiques qui sont en permanence présentes en grand nombre et les désagréments chez les locataires humains du fait de leurs piqûres.

Les habitants de la maison connaissent parfaitement la tique et savent où la trouver. Avant le passage de la mission conduite par Roger en 2000, le propriétaire avait pris contact avec le technicien vétérinaire de Mahitsy (Richard Rakotobe) pour se plaindre de la présence de ces tiques et pour demander de l'aide pour s'en débarrasser. Il semble qu'une désinfection aux acaricides ait été réalisée par le vétérinaire après le passage de la mission mais apparemment cette opération n'avait pas permis d'éliminer les parasites.

Nous avons trouvé la plupart des tiques dans les fentes des murs sur 10 à 15 cm de profondeur et jusqu'à plus de deux mètres de hauteur. En revanche, très peu ont été retrouvées dans la poussière du sol, sol qui ne présentait pas d'anfractuosités ou de crevasses visibles. De très nombreuses exuvies de différentes tailles (larves à nymphes de dernier stade) furent observées au milieu des toiles d'araignées et des débris des murs. Des tiques mortes (sèches, cassantes) faisaient également partie des trouvailles extraites des fentes des parois.

Au cours de notre première visite, environ 216 tiques molles ornithodores vivantes, affamées, de différents stades ont été collectées. Une désinfection avec un acaricide (formulation aqueuse de cyperméthrine) a été appliquée quelques semaines plus tard à la demande du propriétaire et dans l'espoir de le soulager. Nous souhaitions aussi déterminer, lors d'un passage ultérieur, si le traitement avait fait disparaître ou non les tiques.

Deux mois plus tard, 87 tiques vivantes ont encore pu être récoltées en grande profondeur dans les fentes et les fissures des murs, notamment celles encore en partie recouverte de crépis. Dans ces mêmes anfractuosités, des centaines de tiques mortes ont été retrouvées. Trois désinfections successives avec le même produit ont été effectuées juste après cette collecte. Lors d'une nouvelle visite effectuée un mois plus tard, seules trois tiques molles vivantes très affaiblies et plusieurs mortes ont été récoltées. Il est difficile d'en déduire si le local est à présent indemne ou non de ces parasites car nous n'avons pas pu poursuivre ces opérations.

A partir de ces 303 échantillons vivants collectés dans ce local, un élevage de tiques ornithodores a été installé au laboratoire du DRZV/FOFIFA. Ensuite, beaucoup ont été tuées pour être conservées à -80°C avant d'être envoyées au CIRAD Montpellier pour l'analyse. Trois autres fermes distantes successivement de 5, de 50 et de 150 mètres de la porcherie infestée ont été examinées, mais aucune tique n'y a été trouvée (Tableau 2).



Figure 28 : *Ornithodoros porcinus* spp de différents stades collectées lors de cette étude

(De gauche à droite : Nymphe stade 3 gorgée, Nymphe stade 3, Nymphe stade 2 gorgée, Nymphe stade 4, Nymphe stade 4 gorgée, Nymphe stade 5, adulte mâle, adulte femelle gorgée)

(Source : F. Stachurski)



Figure 29 : Ferme infestée de tiques molles à Mahitsy

La recherche de tiques dans les deux autres lieux (Andralanitra et Tsinjoarivo) trouvés infestés lors de la mission de Roger en 2000 a été impossible. A Andralanitra, la destruction récente des bâtiments d'élevage porcin a rendu impossible toute recherche. Comme les porcheries où les tiques ont été collectées par l'éleveur n'étaient pas bien précises géographiquement, aucune visite n'a pu être réalisée à Tsinjoarivo.

Dans les environs d'Antananarivo, à Arivonimamo (situé à 70 km de Mahitsy), sept fermes additionnelles ont été visitées mais aucune tique n'a été trouvée (Tableau 2). Cependant, la similitude des bâtiments et des pratiques d'élevage avec l'élevage de Mahitsy laissait suspecter un résultat équivalent.

3.1.3. Tiques collectées dans les zones de Marovoay et d'Ambatondrazaka où aucune suspicion a priori n'était possible

Dans les zones de Marovoay et d'Ambatondrazaka, 5 et 4 communes (Tableau 2), ont été choisies respectivement pour l'échantillonnage aléatoire. Le nombre estimé de fermes dans chaque commune variait de 25-50 à 300-450 et le nombre prévu de fermes à examiner était de 8 ou 9 par commune.

Pour la zone de Marovoay, 40 fermes ont été visitées dans 5 communes au lieu des 42 prévues par le protocole d'échantillonnage, avec un intervalle de confiance pour la détection de tiques de 95%, sauf dans la commune d'Andranofasika où il n'était que de 90%.

Pour la zone d'Ambatondrazaka, 21 fermes ont été examinées au lieu des 35 prévues, avec un intervalle de confiance de 94% à 80% selon les communes et diminuant à 50% pour le village de Bejofo. Une épizootie de PPA s'est produite dans cette zone au cours de la période d'étude et a stoppé toute investigation sur le terrain pour des raisons de biosécurité.

Sur les 61 fermes visitées au total dans les deux zones, aucune tique n'a été trouvée (Tableau 2).

3.2. Facteurs de présence d'*O. porcinus spp* dans les porcheries

Des données sur la structure des bâtiments d'élevage et les pratiques des éleveurs en termes de traitement des bâtiments et des porcs ont été récoltées dans 108 fermes examinées à la recherche de tiques molles (15, 30 et 63 dans des zones d'Antananarivo-Mahitsy et d'Antananarivo-Arivonimamo, d'Ambatondrazaka et de Marovoay, respectivement). Une ferme à Marovoay a été retirée de l'analyse en raison de l'absence des données.

Le tableau 3 décrit les catégories de variables actives et supplémentaires ainsi que leurs fréquences selon les zones. Les pourcentages cumulatifs d'inertie du premier facteur (F1) et du second facteur (F2) étaient respectivement de 69,52% et 76,25%. Les observations étaient distribuées de façon homogène dans l'espace euclidien de F1 et de F2 et coïncidaient avec la gamme des variables, excepté avec les catégories « aucun toit » et « mur de brique et/ou de terre battue » qui agrandissaient la variance (désaccord) sur F2 et contribuaient à d'autres facteurs non représentés ici. Trois types importants de structure de porcherie ont été identifiés en fonction de leur inertie maximale sur F1 et F2 (Figure 30) :

- a) Les porcheries traditionnelles présentant un plancher en bois ou un sol recouvert de sable et/ou de terre, sans litière pour le couchage des porcs. Les bâtiments sont entourés de poteaux en bois ou de tôles en fer et le toit est recouvert de paille et/ou de feuilles. Ce type est caractéristique des zones de Marovoay et d'Ambatondrazaka. Il est lié à l'absence de traitement des bâtiments d'élevage et à l'absence de tiques molles.
- b) Les porcheries modernes ou améliorées présentant un sol en ciment ou en béton, protégé par de la litière. Les bâtiments sont entourés de murs en briques et/ou en béton, parfois de terre battue. Ils sont généralement recouverts par un toit en tôle. Ce type est caractéristique de la commune d'Arivonimamo dans la zone d'Antananarivo et il est lié au traitement des bâtiments d'élevage.
- c) Un troisième type de structure de porcherie se détache moins clairement de F1 et F2, mais il semble caractéristique de Mahitsy dans la zone d'Antananarivo. D'après l'information additionnelle fournie par les facteurs F3 et F4 (résultats non affichés), ces porcheries pourraient être définies comme des bâtiments de type traditionnel présentant un sol de sable et/ou de terre et entourés de murs en briques et/ou de terre battue. Ce type de porcherie est lié fortement à la présence de tiques : il s'agit d'ailleurs de la seule zone où des tiques ont été trouvées.

Contrairement aux résultats sur les traitements des bâtiments, aucune association entre les types de porcherie et les traitements acaricides prodigués aux porcs n'a pu être trouvée. La proportion d'éleveurs traitant leurs porcs est toujours élevée dans les zones étudiées, s'étendant de 75,81% à 100% (Figure 30), (Tableau 3).

Tableau 3 : Description et fréquence des variables actives et des variables supplémentaires incluses dans l'ACM dans les zones d'étude

| Variable | | | Fréquence de la catégorie donnée (%) | | | | |
|---------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-----|-----|-------|-------|
| | | | En général | (1) | (2) | (3) | (4) |
| Variables actives | Sol | Ciment et/ou concret | 9.35 | 10 | 20 | 10 | 8.06 |
| | | Sable et/ou terre | 61.68 | 90 | 80 | 26.67 | 69.23 |
| | | bois | 28.97 | 0 | 0 | 63.33 | 72.58 |
| | Litière | Sans litière | 88.78 | 30 | 100 | 90 | 96.77 |
| | | Avec litière | 11.22 | 70 | 0 | 10 | 3.23 |
| | Mur | Poteaux en bois et/ou barrière en fer | 79.44 | 0 | 0 | 80 | 98.39 |
| | | Terre | 5.61 | 20 | 0 | 13.33 | 0 |
| | | Briques et/ou terre | 3.74 | 0 | 80 | 0 | 0 |
| | | Bricks et/ou ciment | 11.21 | 80 | 20 | 6.67 | 1.61 |
| | Toit | Sans toit | 5.61 | 60 | 60 | 13.33 | 3.23 |
| | | Paille et/ou feuilles | 85.05 | 0 | 0 | 73.33 | 95.16 |
| | | Tôle | 9.35 | 40 | 40 | 13.33 | 1.61 |
| Variables supplémentaires | Tiques | Absence | 99.06 | 100 | 80 | 100 | 100 |
| | | Présence | 0.94 | 0 | 20 | 0 | 0 |
| | Service traitement (bâtiment) | Absence | 91.59 | 60 | 60 | 100 | 95.16 |
| | | Présence | 8.41 | 40 | 40 | 0 | 4.84 |
| | Traitement de porc | Absence | 15.89 | 20 | 10 | 0 | 24.19 |
| | | Présence | 84.11 | 80 | 90 | 100 | 75.81 |
| | Zone | Antananarivo - Arivonimamo (1) | 9.35 | | | | |
| | | Antananarivo - Mahitsy (2) | 4.67 | | | | |
| | | Ambatondrazaka (3) | 28.04 | | | | |
| | | Marovoay (4) | 57.94 | | | | |

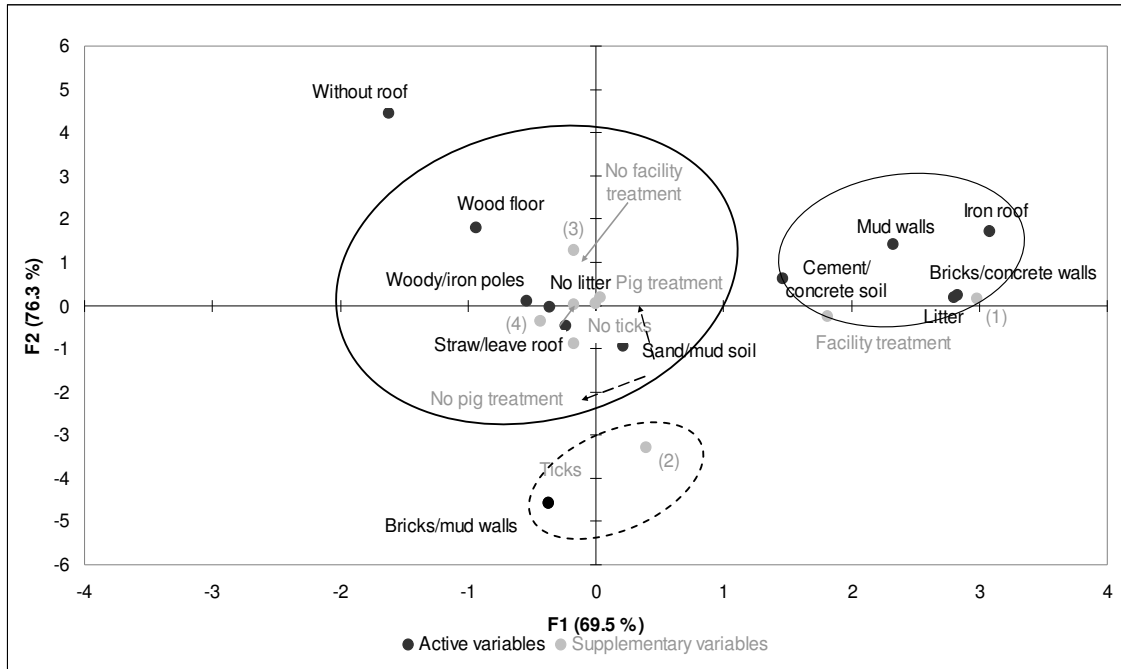


Figure 30 : Représentation graphique avec des coordonnées normales de 4 variables actives (points noirs) et 4 variables supplémentaires (de points gris) sur les deux premiers facteurs F1 et F2 des ACM

Pour les zones Antananarivo-Arivonimamo (1), Antananarivo-Mahitsy (2), Ambatondrazaka (3) et Marovoay (4).

Wood floor =sol en bois

Woody/ iron poles = poteau en bois / barrière en fer

Without roof = sans toit

Straw /leave roof= paille / toit en feuilles

No litter = pas de litière

Sand / mud soil = sable / terre

Briks/mud walls = briques / mur en terre

Iron roof = toit en tôle

Cement / concrete soil = ciment / sol concret

Briks / concrete walls= briques / Mur concret

D'après l'enquête réalisée auprès de 49 éleveurs dans le village d'Arivonimamo, presque tous les éleveurs (85,7%) donnent aux porcs des traitements antiparasitaires, 63,26% d'entre eux le font en prévention contre 32,65% sur la base des signes cliniques. 59,18% ont déclaré avoir observé des poux, 18,37% ont trouvé des puces et 2,05% seulement ont déclaré avoir observé « des tiques » sur leurs porcs. La plupart d'entre eux (88,1%) utilisent l'ivermectine qui est efficace à la fois sur les parasites internes et externes. Pour le traitement des bâtiments, 95,92% des éleveurs nettoient leurs porcheries régulièrement (tous les jours : 82,98% ; chaque semaine : 6,38% ; tous les 15 jours : 4,25% ; tous les deux mois : 4,25%) et 2,13% entre les différentes cohortes de porcs. Cependant, seulement 36,73% désinfectent régulièrement leurs porcheries (chaque semaine : 16,67% ; tous les 15 jours : 22,22% ; tous les mois : 11,11%), après des maladies contagieuses (16,67%), ou entre les différentes cohortes de porcs (16,67%). Le Crésyl, un acaricide efficace à base de crésol, en plus de ses propriétés antibactériennes et antifongiques, est largement utilisé par les éleveurs pour la désinfection. D'après les éleveurs, l'utilisation du Crésyl a largement augmenté avec l'introduction et la diffusion du virus de la PPA depuis 1998.

3.3. Identification moléculaire et phylogénie d'*O. porcinus* spp

3.3.1. Phylogénie de la tique *O. porcinus* spp

Trois séquences du fragment d'ADNr 16S des tiques molles récoltées en 2000 à Mahitsy et trois séquences collectées en 2007-2008 dans le même local ont été analysées. Les séquences amplifiées étaient identiques entre les tiques collectées en 2000 et celles collectées en 2007-2008.

Deux cent soixante treize paires de bases ont été alignées avec les séquences déjà publiées et disponibles pour l'analyse phylogénétique. Pour l'ensemble des séquences incluses dans l'analyse, 94 emplacements ou sites étaient variables et 44 étaient phylogénétiquement informatifs (différences sur un emplacement représentées au moins dans deux séquences différentes). Pour le complexe d'espèce *O. moubata*, 50 emplacements étaient variables et 22 étaient informatifs.

Les tiques malgaches collectées en 2000 et celles de 2007-2008 se distinguaient seulement par une substitution. Les arbres issus des méthodes NJ, P et ML avaient la même configuration. L'arbre de consensus issu de la méthode ML est présenté sur la figure 31.

La monophylie du complexe d'espèces *O. moubata* et la distinction d'*O. moubata sensu stricto*, ainsi que d'*O. porcinus*, ont été vérifiées avec la valeur des BootStraps (BS) de 100%. Les sous-espèces *O. porcinus porcinus* et *O. porcinus domesticus* se différenciaient avec un BS de 89%. Les spécimens d'Afrique du Sud et du Zimbabwe se retrouvaient inclus dans le groupe *O. moubata ss* avec 60% de valeur de BS, suggérant leur classification erronée dans la sous-espèce *O. porcinus porcinus* par erreur d'identification lors de leur collecte sur le terrain. Les tiques malgaches étaient apparentées au spécimen de référence *O. porcinus domesticus* avec 57% de valeur de BS et aux tiques tanzaniennes de la même sous-espèce collectées dans les années 1980 et plus récemment en 2003 (Figure 31).

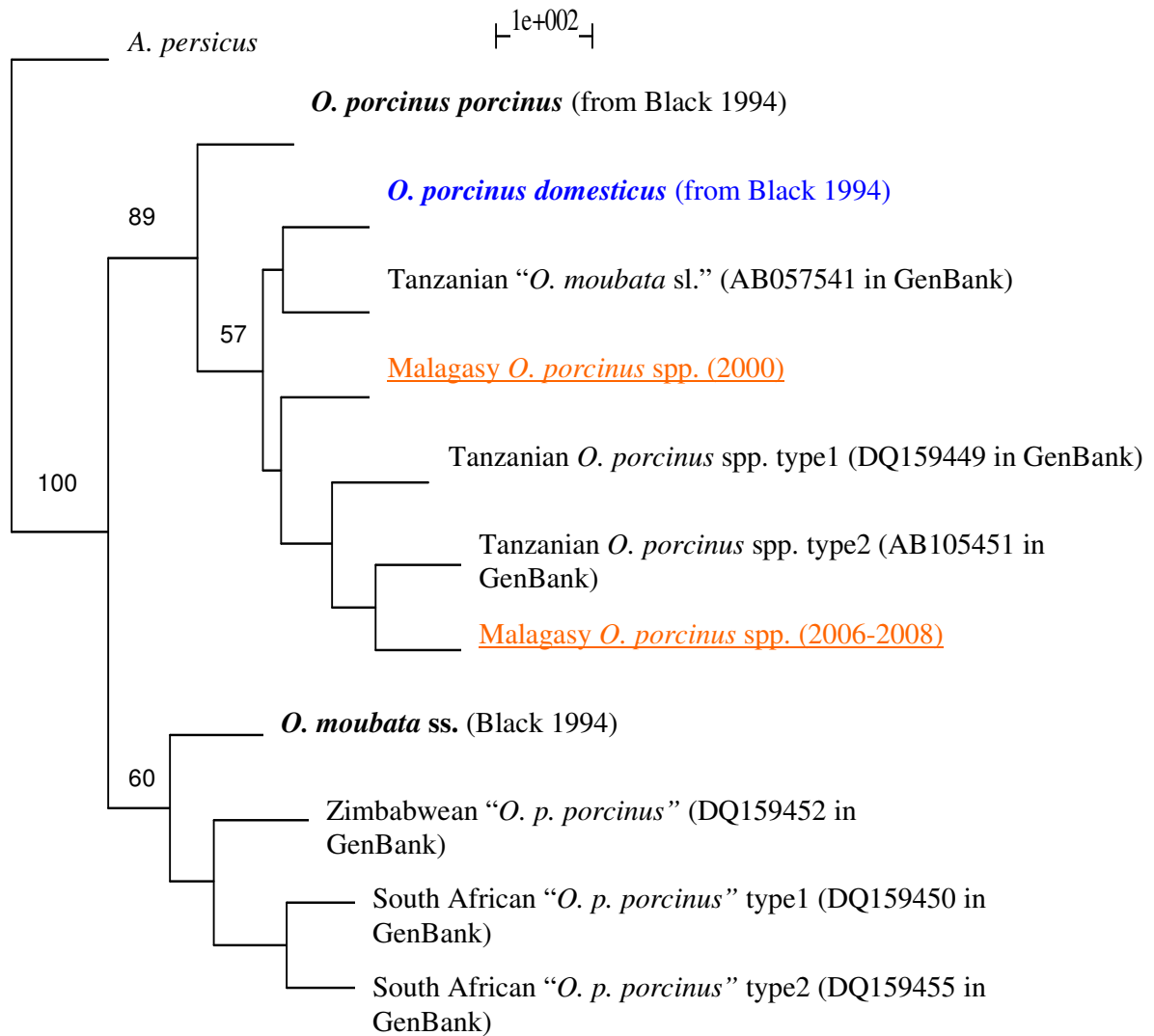


Figure 31 : Arbre phylogénétique des séquences de segment de l'ADNr 16S des tiques malgaches d'espèces *Ornithodoros porcinus*

Cette figure montre l'arbre phylogénétique des séquences de fragment d'ADNr 16S des tiques malgaches d'espèce *O.porcinus spp* collectées en 2000 et en 2006-2008 (les noms sont soulignés), aussi bien que celles d'*O.moubata ss*, d'*O.porcinus porcinus* et les séquences de référence d'*O. porcinus domesticus* (noms en gras) et une autre séquence disponible dans la banque de gènes pour le complexe d'*O.moubata sl* des espèces, utilisant la méthode de maximum de vraisemblance (ML) avec les bootstraps (BS) 1000 et l'addition de séquence aléatoire. BS seulement jusqu'à 50% ont été indiqués et des séquences identiques ont été enlevées pour la simplification.

3.3.2. Détection du virus de la PPA chez *O. porcinus spp*.

3.3.2.1. Amplification du fragment de l'ADNr 16S de tique

Parmi les 97 tiques collectées à Mahitsy en 2000 et analysées, le fragment d'ADNr 16S a pu être amplifié chez seulement 21 tiques (soit 21,6%), très certainement du fait des mauvaises conditions de conservation de ces dernières. Pour celles collectées en 2007-2008 dans le même bâtiment, 161 ont été trouvées positives parmi les 240 analysées, (soit 67,08%). Ce résultat encore faible reflète bien la difficulté communément rapportée à extraire correctement et à amplifier l'ADN de tiques (**Schwartz et al, 1997 ; Hill et al, 2003 ; Hubbard et al, 1995**)

3.3.2.2. Amplification du gène VP72 du virus de la PPA

L'infection par le virus de la PPA a été détectée dans 13 tiques parmi les 182 trouvées positives en ADNr 16S et analysées. Pour les tiques collectées en 2000, 2 tiques sur les 21 positives en ADNr 16S (9,52%) contenaient le virus de la PPA. Pour celles collectées en 2007-2008, 11 tiques parmi les 161 testées étaient infectées par le virus de la PPA (soit 6,83%).

Selon l'éleveur, aucun porc n'avait été introduit dans le bâtiment où les tiques ont été trouvées en 2000 et 2007-2008 depuis 2004 à cause de l'apparition systématique de la PPA après chaque introduction de nouveau cheptel.

Le séquençage de deux fragments amplifiés a confirmé la détection du virus de la PPA et a montré une homologie de 100% avec le gène VP72 de la souche européenne BA71V de référence.

4. Discussion

Notre étude a confirmé la présence d'*O. porcinus spp* dans une porcherie malgache et l'infection naturelle de certains spécimens de tiques par le virus de la PPA. Cette espèce a été trouvée dans la même porcherie du village de Mahitsy à 8 ans d'intervalle alors qu'elle était absente des fermes voisines. Ceci illustre la stabilité des populations d'*O. porcinus spp* et leur faible capacité de dispersion. De telles caractéristiques ont d'ailleurs été mentionnées pour de nombreuses espèces de tiques molles ornithodores et semblent être apparentées à leur type de vie endophile et à leur faible durée de gorgement sur leur hôte vertébré (30 minutes à 1 heure) (Morel, 1969 ; Vial, 2009). A Madagascar, la plupart des tiques ont été trouvées dans les fentes des murs en enduits que nous avons parfois explorées manuellement sur 10 ou 15 cm de profondeur et jusqu'à plus de deux mètres de hauteur. En revanche, très peu ont été retrouvées dans la poussière du sol, sol qui ne présentait pas d'anfractuosités ou de crevasses visibles.

La détection du virus de la PPA dans des tiques collectées en 2000 et en 2007-2008 dans ce même bâtiment d'élevage alors qu'aucune introduction de porcs potentiellement infectés n'a été mentionnée au cours des 4 ans précédant la deuxième collecte, suggère la capacité de persistance du virus dans *O. porcinus spp* de Madagascar. Une telle persistance du virus pendant 5-10 ans dans les mêmes individus, ou au sein de populations de tiques molles ornithodores via la transmission transovarienne et sexuelle, a déjà été rapportée pour des spécimens d'*O. moubata* et *O. porcinus* d'Afrique (Plowright 1970, 1974 ; Rennie 2001) mais ce constat n'avait jamais été vérifié pour Madagascar. Ces résultats suggèrent qu'à Madagascar *O. porcinus spp* pourrait être un vecteur compétent et un réservoir naturel pour le virus de la PPA.

Cependant trouver une tique infectée dans une porcherie ne veut pas forcément dire qu'elle est vecteur ou réservoir. Pour déterminer son rôle exact dans l'épidémiologie de la PPA à Madagascar, des infections expérimentales de tiques malgaches par le virus de la PPA seront réalisées prochainement par Laurence Vial au CIRAD.

D'après nos investigations dans différentes zones géographiques de Madagascar et bien que ces dernières ne se soient pas étendues à tout le territoire, la distribution d'*O. porcinus spp* semble être restreinte. La tique n'a en effet été trouvée que dans le village de Mahitsy situé dans la zone des Hautes Terres près d'Antananarivo et semble être totalement absente des zones de Marovoay et d'Ambatondrazaka. Ces observations confirment les résultats d'études menées dans le passé, soulignant la présence d'*O. porcinus spp* (anciennement *O. moubata*)

dans les maisons traditionnelles en rapport avec la fièvre récurrente humaine dans la partie nord-ouest et ouest du pays puis sa quasi-extinction de ces sites à partir des années 1960-1980 (**Lamoureux, 1913 ; Suldey 1916 ; Poisson 1930 ; Néel, 1949 ; Uilenberg, 1963 ; Fontenille 1988 ; Roger et al, 2001 ; F. Rodhaim, 1989**). Concernant la zone d'Ambatondrazaka, il n'existe jusqu'à présent aucun écrit sur la présence ou l'absence de la tique molle *O. porcinus spp.*

Dans notre protocole, l'échantillonnage aléatoire aurait pu ne pas permettre de détecter la présence d'*O. porcinus spp* si la proportion de porcheries infestées avait été inférieure au seuil de 30% choisi pour l'étude. Toutefois, l'échantillonnage ciblé aurait dû augmenter le niveau de détection, ce qui est le cas pour le village de Mahitsy où la présence de tiques avait été rapportée en 2000 et a été confirmée en 2007-2008. Par contre, aucune tique n'a été trouvée dans les fermes hébergeant des porcs dont les sérums ont été trouvés positifs en ELISA anti-tique. Ce constat pourrait s'expliquer par le délai (deux années) entre le prélèvement de sang chez les porcs et la recherche de tiques dans les élevages, ces derniers ayant pu être désinfectés depuis. En outre, les anticorps anti-tique étant détectables chez les porcs pendant environ 3 mois (**Canals et al, 1990**), l'endroit où était le porc au moment de la détection peut ne pas correspondre à celui où il se trouvait au moment de la piqûre de tiques. C'est particulièrement le cas après la célébration de la fête nationale malgache, quand de nombreux mouvements de porcs sur pieds sont à noter, et qui a eu lieu en juin 2006, juste avant la campagne de prélèvement des porcs. Enfin, cette incohérence des résultats peut être due aux problèmes intrinsèques du test ELISA anti-tique. Développé à l'origine pour *O. erraticus* en Espagne (**Canals, 1990**), ce test pourrait être moins sensible pour *O. moubata* puisque la salive de ce complexe d'espèces est moins antigénique que celle d'*O. erraticus* pour laquelle on pourrait ainsi discriminer plus difficilement les échantillons négatifs et positifs (**Baranda 1997**). Une confusion additionnelle peut résulter de l'utilisation de SGE-2 comme antigène au lieu de sa partie déglycosylée (SGE-2-P) puisque la plupart des sérums de porc semblent avoir des anticorps qui reconnaissent les épitopes localisés sur les chaînes d'hydrate de carbone de SGE-2 tandis que ceux sur des chaînes de polypeptide utilisées dans l'antigène de SGE-2P sont considérés comme plus spécifiques (**Oleaga-Pérez et al, 1994**).

En considérant tous ces éléments ensemble, il semble raisonnable de conclure sur la présence d'*O. porcinus spp* dans la région des Hautes Terres de Madagascar et de supposer que sa distribution spatiale est limitée à cette zone ou à quelques autres non encore identifiées. Seules d'autres investigations de terrain pourront permettre de confirmer ce résultat.

La répartition géographique restreinte d'*O. porcinus spp* à Madagascar pourrait être multifactorielle. Certaines causes d'extinction de la tique dans les zones nord et nord-ouest du pays avaient été proposées par **F. Rodhain** : (i) les variations démographiques avec une population qui n'a cessé d'augmenter, en particulier la population musulmane chez laquelle l'élevage de porc est interdit ; (ii) les améliorations des habitations humaines ; et (iii) l'augmentation du niveau d'hygiène avec l'utilisation plus courante de produits insecticides et acaricides pour lutter contre les poux, les puces vecteurs de la peste ou les moustiques vecteurs du paludisme (**F. Rodhain, 1989**).

L'étude de la typologie des bâtiments d'élevage porcins a montré que certains types de bâtiments pouvaient être plus ou moins appropriés à la présence de tiques molles. Les porcheries traditionnelles des zones de Marovoay et d'Ambatondrazaka (Figure 32) sont essentiellement des structures ouvertes peu compatibles au mode de vie endophile et photophobe d'*O. porcinus spp* bien que le climat externe semble favorable au développement de cette tique, du moins dans la zone de Marovoay (**Walton, 1962 ; Morel, 1969 ; Vial, 2009**). A l'inverse, les conditions climatiques froides des Hautes Terres dans la zone d'Antananarivo semblent moins appropriées à cette tique mais les bâtiments traditionnellement utilisés pour l'élevage des porcs possèdent des murs en briques ou en terre battue et un sol en terre ou en sable pouvant protéger des variations climatiques extrêmes et maintenant ainsi un microclimat intérieur stable, propice au développement des tiques (**Walton, 1962**). Ces habitats ne présentent aucune ouverture à l'exception de la porte (Figure 29), et maintiennent ainsi l'obscurité nécessaire aux tiques molles endophiles. Toutefois, dans la même zone, aucune tique n'a été trouvée dans les porcheries quasi-similaires mais néanmoins plus modernes d'Arivonimamo. Des désinfections plus fréquentes à base de Crésyl sont effectuées et pourraient empêcher l'installation des tiques dans ces bâtiments. Les effets anthropiques comme l'utilisation croissante ces dernières décennies d'insecticides pour la prévention de la peste humaine et de la malaria, ou lors de l'introduction de PPA dans l'île, ont en effet été rapportés. Enfin, dans le futur, il serait intéressant d'étudier l'historique du climat à Madagascar, afin d'identifier les changements climatiques potentiels qui pourraient avoir mené à des modifications de la distribution d'*O. porcinus spp*.

Cette étude faite en collaboration avec le CIRAD a permis de clarifier le statut phylogénétique d'*O. porcinus spp* colonisant les porcheries à Madagascar. Comme suggéré précédemment par Uilenberg en 1963, notre analyse phylogénétique montre que les tiques malgaches appartiennent à la sous-espèce *O. porcinus domesticus* bien qu'elles partagent quelques

caractéristiques proches de la sous-espèce *O. porcinus porcinus*. Elles sont phylogénétiquement très proches des tiques molles tanzaniennes qui transmettent *Borrelia duttonii*, l'agent étiologique de la fièvre récurrente à tiques chez l'homme (**Fukugana, 2001 ; Mitani 2004**). Ce dernier résultat suggère que les mêmes tiques puissent maintenir et transmettre à la fois un microbe pathogène humain et un microbe pathogène animal selon les hôtes qu'elles rencontrent et leur disponibilité dans leur habitat. Ce caractère est typique des tiques molles endophiles qui, comme stratégie adaptative, choisissent de se nourrir sans discrimination sur tel ou tel hôte vertébré (**Vial, 2009**). Ce résultat est également cohérent avec des similitudes télomériques notées dans le génome du virus de la PPA et celui de *Borrelia*, ces deux pathogènes pouvant être considérés comme deux agents primaires de tiques (**Hinnebusch et Barbour, 1991**). Ainsi, la tique décrite depuis le XVIII^{ème} siècle par Drury en 1720 et transmettant la fièvre récurrente malgache dans l'ouest du pays pourrait être la même que celle découverte plus tard dans les porcheries malgaches des Hauts Plateaux et au nord-ouest de l'île par Uilenberg en 1963, Fontenille en 1988 et Roger en 2000.



Figure 32 : Types de porcheries traditionnelles
(À gauche dans la zone de Marovoay et à droite dans la zone d'Ambatondrazaka)

5. Conclusion

La présente étude a pu confirmer la présence d'*O. porcinus* dans une porcherie à Mahitsy dans la zone d'Antananarivo. Il a été démontré également que ces tiques se rapprochent phylogénétiquement des tiques *O. moubata* tanzaniennes et que les espèces malgaches sont étroitement liées aux sous-espèces *O. porcinus domesticus*.

Le fait de trouver des tiques dans le même bâtiment d'une porcherie à Mahitsy huit années après la première découverte, alors qu'elles sont absentes dans les bâtiments de la porcherie voisine, a confirmé que ces tiques sont très sédentaires et ont une faible capacité de dispersion.

L'infection dans les conditions naturelles des tiques par le virus de la PPA a été confirmée en amplifiant le gène VP72 du virus, avec une prévalence de 9,52% pour les tiques collectées en 2000 et de 6,83% pour celles qui ont été collectées en 2007 et 2008.

La détection du virus dans les tiques collectées en 2000 et en 2007-2008, sans introduction de porcs potentiellement infectés pendant au moins les 4 ans précédant la deuxième collecte, démontre la capacité de persistance du virus à long terme dans les tiques *O. porcinus domesticus* malgaches. De futures études sur la compétence vectorielle par des infections expérimentales seront effectuées pour confirmer ce rôle.

La distribution de la population de tiques malgaches, *O. p. domesticus*, est apparemment très restreinte car elle n'a été trouvée que dans un seul local dans la zone d'Antananarivo-Mahitsy. Les porcheries traditionnelles de cette zone sont sans doute plus appropriées à cette espèce parce que, en général, les porcheries sont situées au rez-de-chaussée des habitations humaines traditionnelles construites avec des murs en terre battue ou en briques de terre. Ces murs contiennent des fentes et les fissures qui constituent un micro-habitat idéal pour le développement de ces tiques.

Dans les zones de Marovoay et d'Ambatondrazaka, aucune tique n'a été trouvée. Les porcheries de ces deux zones sont certes en majorité traditionnelles aux structures ouvertes et peu convenables pour les espèces *O. porcinus spp* qui sont des tiques endophiles.

Plusieurs raisons ont été également avancées dans cette étude pour expliquer l'absence de tiques dans ces zones étudiées. La conception du test Elisa anti-tique, qui était à l'origine destiné aux espèces européennes *O. erraticus* et non pour les espèces africaines *O. porcinus spp*, pourrait jouer un rôle ; le grand intervalle de temps entre le prélèvement de sérum et la recherche des tiques dans la porcherie, ainsi que les mouvements de porcs (échanges, commerce etc..) sont également autant de facteurs pouvant expliquer l'absence des tiques.

De même, il faut noter qu'aucune tique n'a été trouvée dans le village d'Arivonimamo : la plupart des élevages sont semi-modernes ou modernes et les bâtiments désinfectés par le crésyl.

Chapitre 3 : Etude du rôle de *Potamochoerus*

***larvatus* dans l'épidémiologie de la PPA à**

Madagascar

1. Objectifs

Il s'agit d'étudier la circulation du virus de la PPA dans la population de potamochères malgaches vivant en contact avec les élevages porcins dans la région nord-ouest de l'île et d'élucider le rôle potentiel de ces suidés dans l'épidémiologie de la maladie. Il est également important d'évaluer l'existence d'un contact potentiel entre les potamochères et les tiques molles d'une part, et entre les porcs domestiques et les potamochères d'autre part dans la zone d'étude.

2. Matériel et méthode

La méthodologie adoptée a été identique à celle de l'étude du rôle des tiques molles sur la PPA (chapitre II) : sélection des zones d'étude, collecte des données et analyses des données obtenues.

2.1. Collecte des données

Après la détermination du nombre d'échantillons à étudier, des enquêtes ont été menées auprès des chasseurs ; des prélèvements d'organes et de sang ont été effectués chez les potamochères pour analyse au laboratoire. Les exploitations des données obtenues ont bouclé la présente étude.

2.1.1. Détermination du nombre d'échantillons de potamochère à étudier

Puisqu'aucune donnée sur l'écologie des potamochères malgaches n'a été trouvée dans la littérature, des données d'Afrique du Sud (Seydack, 1990) ont été utilisées comme base pour le calcul de la population de potamochères dans la zone d'étude. Cette population a été estimée à 780 à 1300 individus.

En dépit des études rapportant le rôle des potamochères comme hôte et réservoir potentiel du virus, les données sur la prévalence de la PPA chez cette espèce sont rares dans la littérature courante. Les données les plus précises trouvées dans la littérature sur ce sujet rapportent que la prévalence de la PPA chez les potamochères est probablement 10 fois inférieure à celle des phacochères (**Plowright et al, 1994**).

Puisque la prévalence de la PPA chez les phacochères en Afrique australe et en Afrique orientale est habituellement 90% environ (**Plowright, 1981 ; Plowright et al, 1994**), une valeur de 8% a été utilisée comme prévalence plausible chez les potamochères pour cette étude. A partir de valeur estimée de la prévalence, le calcul a été fait en utilisant le logiciel Win épiSCOPE 2.0 (**Thrusfield et al, 2001**) et en prenant les modules « détection de la maladie » : un échantillon de 35 animaux serait suffisant pour détecter au moins un animal infecté par le virus de la PPA dans une population contenant plus de 1500 animaux, avec un intervalle de confiance de 95%.

2.1.2. Collecte des prélèvements

Une étroite collaboration a été mise en place avec les chasseurs durant l'étude pour pouvoir obtenir des prélèvements de potamochères. Tous les échantillons de sang, de sérum et de rate ont été prélevés sur des potamochères vivants capturés par les chasseurs traditionnels.

Le protocole du projet a été utilisé (Voir Annexe 13):

a) Les organes de potamochères

Un bout de rate de 5 cm environ de diamètre a été prélevé et placé dans un flacon de 100 ml contenant une solution de PBS et 100 µg/ml d'une solution de pénicilline et de streptomycine. Le flacon a été placé à 4°C pendant le transport et à -80°C au laboratoire jusqu'à l'analyse pour préserver l'infectiosité du virus. Cette dernière est altérée à -20°C, mais l'ADN viral pourrait être détecté plusieurs semaines plus tard si l'échantillon est gardé à 4°C.

b) Le sang et le sérum de potamochère

Le sang de potamochère a été collecté tout d'abord dans un tube avec EDTA, puis 100 µl de cet échantillon ont été déposés sur un papier Whatman FTA (Figure 33) et sur un bout de papier filtre Whatman 3MM de dimension 1cm x 5 cm (Figure 33). Les papiers ont été ensuite séchés par exposition en plein air pendant 5 minutes à l'ombre. Chaque papier filtre a été

gardé dans un sachet sec en plastique, stérile, contenant un gel de silice pour être stocké à 4°C pendant le transport et au laboratoire.

Le sérum de potamochère a été collecté à partir de sang prélevé dans un tube vacutainer de 5 ml (Figure 33). Le sérum a été récolté, stocké dans un tube Eppendorf de 1,8 ml et à une température de 4°C pendant le transport, puis stocké à -80°C au laboratoire dans la banque de sérums. Les anticorps dirigés contre le virus pourraient être détectés après plusieurs mois si le sérum est conservé à la température de +4°C.

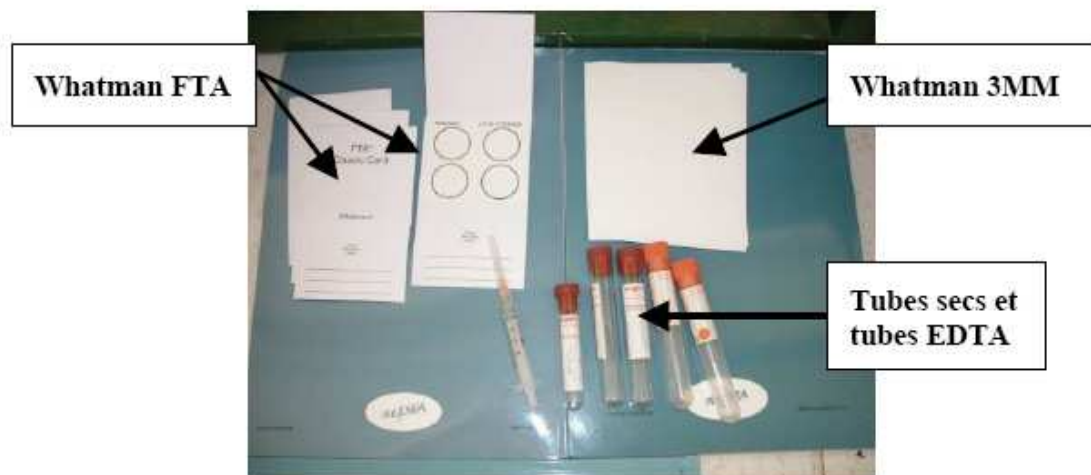


Figure 33 : Les matériels de prélèvement (source : Le Glaunec 2006)

c) Les sérums de porcs domestiques

Des sérums de porc domestiques prélevés dans les fermes et à l'abattoir des trois zones d'étude (Marovoay, Ambatondrazaka et Arivonimamo) ont été soumis au test ELISA anti-tique en vue de déterminer un contact potentiel entre les porcs domestiques et les tiques molles. Ces sérums ont été prélevés lors de la précédente étude menée en 2006 par une autre équipe de chercheurs travaillant sur la surveillance épidémiologique de la PPA chez les porcs domestiques dans le cadre du même projet Wellcome Trust.

2.2. Analyses des prélèvements au laboratoire

Trente-cinq prélèvements de tissu de rate, trente-cinq échantillons de sang sur papier buvard FTA et sur papier filtre 3MM et 27 sérums de potamochères ont été collectés entre juin et septembre 2006. Les échantillons obtenus appartenaient à une même population de

potamochères de la région forestière et ceux du Parc National d'Ankarafantsika, dans la zone de Marovoay (Figure 23).

Les prélèvements de rate qui ont été stockés à -80°C, et les papiers filtres 3MM et les papiers buvards FTA stockés à +4°C ont été envoyés et analysés par nous-même au laboratoire de virologie du CIRAD Baillarguet à Montpellier en vue d'une détection du virus de la PPA par la PCR. Par contre, nous avons analysé les sérums de potamochères et de porcs domestiques qui ont été envoyés à Madrid (Espagne) au laboratoire de référence de l'INIA pour la détection des anticorps anti-VP73 et anti-p30 du virus de la PPA, grâce à des différents tests sérologiques : ELISA indirect utilisant la protéine virale VP73 du virus, ELISA utilisant la protéine recombinante p30 (Kit ALGENEX) et Western Blot utilisant la protéine recombinante p30. Ces sérums ont été également envoyés au laboratoire IRNASA à Salamanque (Espagne) pour être analysés avec le test ELISA en vue de la détection d'anticorps anti-tique utilisant, comme un antigène de la glande salivaire d'*O. moubata*.

2.2.1. Analyse virologique par la réaction d'amplification du gène de virus de la PPA

2.2.1.1. Analyse des échantillons de sang de potamochères (sur papiers filtres 3MM et sur papiers buvards FTA)

Les échantillons de sang déposés sur les deux types de papier filtre nous ont permis de déterminer lequel des deux est le mieux adapté pour l'étude. Des expériences menées au laboratoire IAH de Pirbright en Angleterre avaient indiqué que le virus pourrait être détecté par PCR dans ces deux types de papier filtre, même avec un titre viral inférieur à 10^3 /ml. Le test sur papier filtre 3MM a été mis au point au CIRAD par Michaud en 2004 (**Michaud et al, 2004**) et présente une sensibilité élevée car le virus a pu être détecté dans un titre viral de 10/ml.

Pour le test d'amplification génomique du virus, le protocole qui a été utilisé pour la présente étude est le celui du projet Wellcome Trust (Voir Annexe 13), utilisant la solution Master Mix d'Eppendorf et le couple d'amorces (PPAVP72 sens et PPAVP72 rev) qui a respectivement comme séquences :

5'-TCGGAGATGTTCCAGGTAGG-3' et 5'-CGCAAAAGGATTTGGTGAAT-3' pour amplifier la protéine VP72 composée de 346 paires de base. L'amplification a été réalisée sur 35 cycles.

Il faut noter que les bouts de papiers filtres 3MM ont été déposés directement dans les microtubes pour PCR sans passer par une phase d'extraction d'ADN, tandis que les morceaux de papier buvard FTA ont été lavés selon le protocole Whatman FTA BD08 (voir Annexe 12) et déposés dans les microtubes pour PCR, sans passer également par une phase d'extraction d'ADN.

a) Préparation de la solution pour la réaction

Le volume final de la solution est de 50 µl. Elle est composée de :

- 20 µl de la solution Master mix d'Eppendorf à 2,5X
- 21,8 µl d' H₂O
- 1,6 µl d'amorce VP72 sens (10 pmol/µl)
- 1,6 µl d'amorce VP72 rev (10 pmol/µl)
- 1 disque de 2 mm de diamètre de papier filtre 3MM ou de papier buvard FTA, qui est équivalent à 1 µl d'ADN, a été déposé dans le microtube de PCR.

b) Amplification de l'ADN

Les microtubes contenant la solution réactionnelle ont été déposés dans une machine PCR thermo-cycler (Applied Bio System) selon le programme suivant :

- 5 minutes à 95°C
- 35 cycles x 95°C 30 secondes / 55°C 30 secondes / 72°C 30 secondes
- 7 minutes à 72°C.

c) Séparation par électrophorèse

Dix µl d'amplicon ont été déposés avec 3 µl de bleu de charge dans chaque puits du gel préparé avec 1% d'agarose dans la solution de TBE. Le gel contient de la solution de bromure d'éthidium (2 à 3 gouttes). L'électrophorèse a été réalisée pendant une heure sous une tension de 120 volts.

d) Lecture des résultats

La lecture des résultats a été effectuée à l'aide d'un ordinateur sous une lumière ultra-violette. Les échantillons positifs ont présenté une bande ayant une taille de 346 paires de base, comme celle du contrôle positif. Par contre, aucune bande ne devrait être vue pour le contrôle négatif.

2.2.1.2. Analyse d'échantillons de rate de potamochères

a) Préparation de l'homogénat de l'échantillon

Un échantillon de rate de 5 g environ a été lavé 3 fois avec de la solution de PBS, puis broyé avec le broyeur à ultrasons dans 2 ml de solution EMEM (Eagles Minimum Essential Medium, complétée avec 50U/ml de pénicilline, de streptomycine et de l'Amphotéricine B (antifongique)). L'ensemble a été ensuite récupéré dans un tube Eppendorf de 1,8 ml et centrifugé à 8000 rpm pendant 3 minutes. Le surnageant est récolté dans un autre tube Eppendorf et conservé à -80°C jusqu'à l'extraction d'ADN.

b) Extraction d'ADN de la rate

Le Kit « GFX genomic blood DNA purification » de l'Amersham Biosciences (Cat 27-9603-01) a été utilisé lors de l'étude pour l'extraction d'ADN. Ce kit est composé de :

- Solution de lyse RBC (solution 1) : 10 mM KHCO₃ ; 155 mM NH₄Cl ; 0,1 mM EDTA.
- Solution d'extraction (solution 2) : solution tamponnée contenant des éléments chaotrope et du détergent.
- Solution de lavage : solution tamponnée de Tris-EDTA avec de l'éthanol brut (l'éthanol n'est pas fourni dans le kit)
- Colonnes GFX : colonnes de Micro Spin pré-emballées avec une matrice de fibres de verre
- Tubes de collection : microtubes de 2 ml pour la centrifugation.

Le tube contenant le surnageant conservé à -80°C a été décongelé. 200 µl de ce liquide ont été mélangés aux 500 µl de la solution 1 du kit. Le mélange est ensuite laissé pendant 1 minute à la température ambiante, puis transféré dans un tube de colonne GFX pour être centrifugé à 8000 rpm pendant une minute. Le liquide se trouvant en bas de la colonne a été jeté et le contenu retenu dans la membrane gardé ; 500 µl de la solution 2 du kit sont ajoutés à ce contenu et le mélange est de nouveau centrifugé à 8000 rpm pendant une minute. Le liquide dans le tube de collection a été de nouveau jeté tandis que le contenu retenu dans la membrane mélangé avec 500 µl de solution de lavage du kit. La solution de lavage a été diluée avec de l'éthanol avant utilisation (12 ml de solution de lavage + 48 ml d'éthanol). Le contenu du tube est centrifugé à 13 200 rpm pendant 3 minutes ; la solution dans le tube de collection a été jetée alors que 50 µl de H₂O à 70°C ont été ajoutés au contenu retenu dans la membrane pour l'élution. L'ensemble a été ensuite placé à la température ambiante pendant une minute. Après une centrifugation à 8000 rpm pendant une minute, le contenu de la membrane a été jeté tandis que la solution se trouvant dans le tube de collection et contenant l'ADN gardée. Elle est conservée à +4°C pour être analysée par la suite en PCR.

c) Amplification de l'ADN du virus par PCR

Le protocole utilisé est celui recommandé par le projet Wellcome Trust PPA (en Annexe 13), utilisant le Master Mix Eppendorf et le couple d'amorces :

PPAVP72 sens (5'-TCGGAGATGTTCCAGGTAGG-3')

et PPAVP72 rev (5'-CGCAAAAGGATTTGGTGAAT-3').

Cette méthode a été adoptée pour amplifier la protéine VP72 codée par le gène du virus, qui est composé de 346 paires de base. L'amplification est réalisée sur 35 cycles.

La solution réactionnelle PCR ayant un volume final de 50 µl est composée de :

- 20 µl de Master mix d'Eppendorf 2.5X
- 21,8 µl d' H₂O
- 1,6 µl d'amorce VP72 sens (10 pmol/µl)
- 1,6 µl d'amorce VP72rev (10 pmol/µl)
- 5 µl de la solution d'ADN de rate

Les microtubes contenant la solution réactionnelle ont été déposés dans une machine PCR thermo-cycler (Applied Bio System) selon le programme suivant:

- 5 minutes à 95°C
- 35 cycles x 95°C 30 secondes / 55°C 30 secondes / 72°C 30 secondes
- 7 minutes à 72°C.

d) Séparation par électrophorèse

10 µl d'amplicon mélangés à 3 µl de bleu de charge ont été déposés dans chaque puits du gel préparé avec 1% d'agarose dans la solution de TBE. Le gel contient de la solution de bromure d'éthidium (2 à 3 gouttes). L'électrophorèse a été réalisée pendant une heure sous 120 volts.

e) Lecture des résultats

La lecture des résultats a été effectuée à l'aide d'un ordinateur sous une lumière ultra-violette. Les échantillons positifs ont présenté une bande ayant une taille de 346 paires de base comme celle du contrôle positif ; par contre aucune bande ne devrait être vue pour le contrôle négatif.

2.2.2. Analyse sérologique des sérums de potamochères et de porcs domestiques

Différents tests sérologiques ont été appliqués sur les 27 sérums de potamochères et les 271 sérums de porcs domestiques en vue de détecter les anticorps anti-virus de la PPA d'une part, et les anticorps anti-tique d'*O.moubata* d'autre part.

2.2.2.1. Tests sérologiques pour la détection d'anticorps dirigés contre le virus de la PPA

a) Test ELISA utilisant la protéine recombinante p30

Ce test ELISA (ALGENEX ou Alternative Gene Expression) produit par le département de biotechnologie du CISA/INIA (Madrid, Espagne) utilise la protéine recombinante p30 comme antigène. L'antigène utilisé dans cette étude est extrait du virus E70 qui a été fourni par Jose Escribano (escribano@inia.es).

Le test sérologique utilisant des protéines recombinantes comme antigène a été décrit par différentes études (Alcaraz et al, 1995 ; Oviedo et al, 1997) selon le protocole de Perez-Filgueira en 2006 (Perez-Filgueira et al 2006). L'antigène est une protéine codée par le gène CP204L du virus de la PPA, la protéine p30 recombinée avec le Bacp30 (*Baculovirus*) inoculée à une larve de *Trichoplusia ni* (Barderas et al. 2000). Ce test a une spécificité élevée et réduit énormément les cas de faux positifs.

La première, la troisième, la cinquième et la septième ligne de la microplaque à 96 cupules (Polysorp, Nunc, Danemark) ont été tapissées par 100 µl d'antigène recombinant dilué à 1/20, alors que les autres lignes de la microplaque ont été laissées sans antigène. La microplaque a été ensuite incubée à +4°C pendant une nuit avant d'être lavée avec une solution de PBS Tween 20.

100 µl de solution de PBS Tween 20 mélangés à du sérum de bovin à 2% (BSA, Sigma, réf. A-7906) ont été ensuite déposés dans chaque puits de la microplaque avant une incubation pendant une heure à 37°C. Après lavage, une quantité de 100 µl de chaque échantillon à tester, diluée au 1/100, a été déposée en duplication (dans une ligne où il y avait l'antigène et dans une ligne où il était absent), et la plaque a été incubée à 37°C pendant une heure. Après un lavage avec de la solution de lavage, 100 µl de conjugué (anti-pig IgG-Horse Radish Peroxydase) dilués au 1/2000 dans du PBS Tween 20 et du sérum de bovin 2% ont été ajoutés dans chaque cupule de la microplaque qui a été ensuite incubée à 37°C pendant une heure.

Après un nouveau lavage, 100 µl de substrat (ABTS-H₂O₂) (KPL réf. 50-66-01) ont été déposés dans chaque cupule avant une incubation à la température ambiante dans la chambre noire pendant 5 à 10 minutes. La réaction a été stoppée par l'ajout de 100 µl de solution de SDS 1% dans chaque cupule de la microplaque.

La lecture de la microplaque a été faite à 405nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le ratio entre la valeur de densité optique de la cupule contenant l'antigène et celle de la cupule sans antigène nous a permis de distinguer les échantillons négatifs et les échantillons positifs.

Calcul de ratio R pour chaque sérum : $R = DO_{Ag+} / DO_{Ag-}$

- Si $R < 2$, le sérum est classé comme « négatif ».
- Si $R > 2$ ou $R = 2$, le sérum est classé comme « positif ».

b) Test ELISA utilisant le kit INGENASA (« blocking ELISA »)

Le protocole d'analyse a utilisé le kit ELISA INGENASA (Ingezim PPA Compac 1.1 PPA .K3) produit par le laboratoire CISA/ INIA, à Madrid (Espagne). L'antigène utilisé était l'antigène purifié VP73 extrait du virus de la PPA de la souche européenne E70. La microplaque utilisée était déjà imbibée de cet antigène VP73 et tous les réactifs ont été fournis avec le Kit et ils ont été prêts à l'utilisation.

50 µl de sérum ont été déposés, avec 50 µl de diluant (DEO1-01), dans chaque cupule de la microplaque en duplication. Le mélange a été ensuite incubé à 37°C pendant une heure ou à la température ambiante pendant une nuit. Les sérums de contrôle positifs et négatifs ont été traités dans les mêmes conditions. La microplaque a été ensuite lavée 4 fois avec la solution de lavage. 100 µl de conjugué à base de peroxydase ont été mis dans chaque cupule et la microplaque a été ensuite incubée pendant 30 minutes à 37°C. Après lavage de la microplaque, 100 µl de substrat constitué de TMB ont été placés dans chaque cupule et la microplaque a été maintenue à la température ambiante pendant 15 minutes. La réaction a été ensuite arrêtée par addition de 100 µl de solution d'arrêt dans chaque cupule et finalement la microplaque a été lue à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm.

Calcul de « Cut- Off » ou seuil de positivité

Le test est valide si la valeur de la densité optique des contrôles négatifs est supérieure ou égale à 0,7 et si le rapport entre les valeurs de densité optique des contrôles négatifs et positifs est supérieur ou égal à 4.

$DO(\text{nég}) > \text{ou} = 0,7$

$DO(\text{nég}) / DO(\text{pos}) > \text{ou} = 4$

$$\text{Cut-Off positif} = \text{DO (nég)} - ((\text{DO nég} - \text{DO Pos}) \times 0,5))$$

$$\text{Cut-Off négatif} = \text{DO (nég)} - ((\text{DO nég} - \text{DO Pos}) \times 0,4))$$

Les sérums ayant une DO < Cut-Off positif sont considérés comme « positifs »

Les sérums ayant une DO > Cut-Off négatif sont considérés comme « négatifs »

Les sérums ayant une DO entre le Cut-Off positif et le Cut-Off négatif sont considérés comme « douteux ».

Il faut noter que les négatifs sont plus colorés que les positifs dans ce test.

c) Test « Western Blot » ou « immuno-blotting » utilisant la protéine recombinante p30

Il s'agit d'une méthode utilisée pour la détection d'anticorps spécifique. Une phase de cette méthode consiste à transférer sur une membrane en nitrocellulose les protéines séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrilamide en présence de SDS. L'anticorps contenu dans le sérum est incubé avec la bandelette de nitrocellulose qui renferme les fractions antigéniques. L'anticorps spécifique se lie à l'antigène et le complexe immun est révélé par un deuxième anticorps lié à un enzyme. Une coloration sous forme d'une bande nette horizontale apparaît sur la bandelette résultant de la réaction enzymatique avec le substrat.

Le « Western Blot » constitue un test utilisé pour confirmer les résultats positifs et douteux du test ELISA du fait de sa spécificité élevée. L'antigène utilisé est la protéine recombinante p30 purifiée de *Baculovirus*, inoculée dans la larve de *Trichoplusia ni*, produite par le département de Biotechnologie de CISA/ INIA Espagne.

La procédure de la production de l'antigène a déjà été développée dans le chapitre sur le test ELISA utilisant la protéine recombinante p30. Les bandelettes ont été fournies par Jose Escribano (escribano@inia.es), Madrid Espagne.

La bandelette a été plongée dans une cuve contenant 0,5 ml de solution de blocage (PBS Tween 20 et 4% de lait écrémé) et incubée pendant une heure avec agitation à la température ambiante ; après lavage, 0,5 ml de sérum dilué à 1/50, a été déposé dans la cuve et incubé avec la bandelette à la température ambiante sous agitation pendant une heure. Après lavage avec la solution de blocage, 0,5 ml de conjugué (protéine A-horseradish peroxydase, SIGMA, USA) dilué à 1/2000 a été déposé et incubé pendant une heure à 37°C sous agitation. La bandelette a été de nouveau lavée avec de la solution de blocage et la réaction finalement

révélée par addition de 0,5 ml de substrat (solution de 0,3% de 4-chloronaphtol, Merck 11952) et d'une solution de méthanol et de H₂O₂ 30% (Panreac 131058). La réaction est ensuite stoppée après 5 minutes en ajoutant de l'eau distillée. Les sérums présentant une bande correspondant à celle de la protéine p30 qui sert de contrôle sont considérés comme positifs.

2.2.2.2. Tests sérologiques pour la détection de l'anticorps anti-tique *O.moubata*
(Voir la méthode dans le chapitre 2, Partie II)

3. Résultats

3.1. Résultats d'analyse virologique par PCR des prélèvements de potamochères

La détection du virus de la PPA par amplification du gène VP72 sur 35 prélèvements de tissu de rate de potamochère et sur 35 échantillons de sang de potamochère sur papier buvard FTA et sur papier filtre 3MM, a donné des résultats négatifs pour tous les échantillons. Aucune bande de la même taille que celle du contrôle positif (346 paires de base) n'a été détectée lors de la réaction.

3.2. Résultats d'analyse sérologiques des sérums de porcs domestiques et de potamochères

3.2.1. Résultats du test ELISA pour la détection d'anticorps dirigé contre le virus de la PPA chez les potamochères

Les 27 sérums de potamochères qui ont été testés avec les deux types d'ELISA étaient tous négatifs.

3.2.2. Résultats du test ELISA pour la détection d'anticorps dirigé contre le virus de la PPA chez les porcs domestiques

3.2.2.1.Résultat des sérums des porcs domestiques en ELISA utilisant le kit INGENASA

Un seul sérum de porc domestique, prélevé à Ambatondrazaka, présentait une densité optique considérée comme positive parmi les 271 analysés. Ce sérum porte l'identification N° 295.

3.2.2.2.Résultat des sérums des porcs domestiques en ELISA (ALGENEX) utilisant la protéine recombinante p30

Parmi les 271 sérums de porc analysés avec ce test, 6 sérums portant les identifications suivantes : N° 227, N° 203, N° 213, N° 286, N° 346 et N° 352 étaient douteux. Le sérum trouvé positif avec le précédent test restait toujours positif avec une valeur de ratio R de 4,5 : il s'agit du sérum N° 295 (Figure 34).

3.2.2.3.Résultat des sérums des porcs domestiques en « Western Blot » ou « immuno-blotting » utilisant la protéine recombinante p30

Les six sérums de porc domestique considérés comme douteux avec le test ELISA utilisant la protéine recombinante p30, ainsi que le seul sérum positif, ont été soumis au « Western Blot » en vue de la confirmation des résultats obtenus.

Seul le sérum N° 295 trouvé positif avec le précédent test était confirmé comme positif par le « Western Blot » (Figure 35). Il faut noter que les 27 sérums de potamochères n'ont pas été analysés avec ce test car ils étaient tous négatifs avec les tests ELISA appliqués.

RESULTATS DE L'ELISA ET WESTERN BLOT UTILISANT la rp30 comme antigène

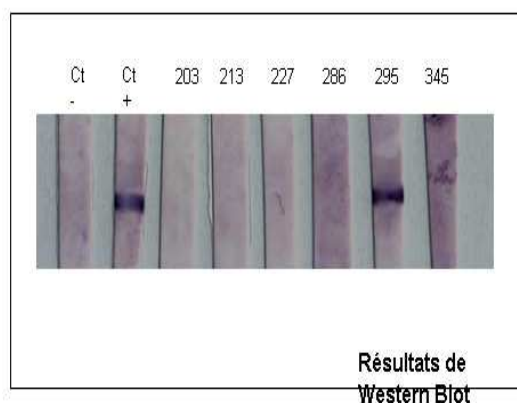
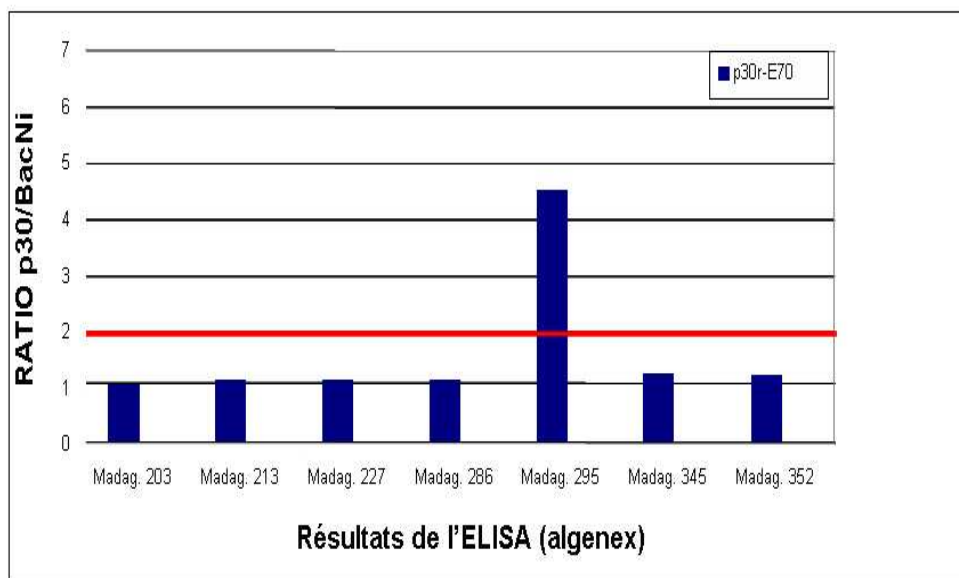


Figure du haut

Figure 34: Résultats des sérums douteux et positif avec ELISA utilisant le kit ALGENEX

(Madag 295 : sérum positif

Madag 203, Madag 213, Madag 227, Madag 286, Madag 345, Madag 362 : sérums douteux)

Figure du bas

Figure 35: Résultat du test « Western Blot » montrant un sérum positif (sérum N° 295)

3.2.3. Résultats du test ELISA pour la détection d'anticorps anti- tique *O.*

moubata chez les porcs et chez les potamochères

Les 27 sérums de potamochères analysés avec ce test ont été trouvés négatifs. Par contre, parmi les 271 sérums de porcs domestiques, 106 sérums (39,1 %) ont été trouvés douteux et 3 (1,1%) positifs (Figure 36). Ces sérums trouvés positifs ont été avaients prélevés dans la zone de Marovoay : le N° 562 et le N° 572 prélevés à Andranofasika, et le N° 598 prélevé à Morafeno.

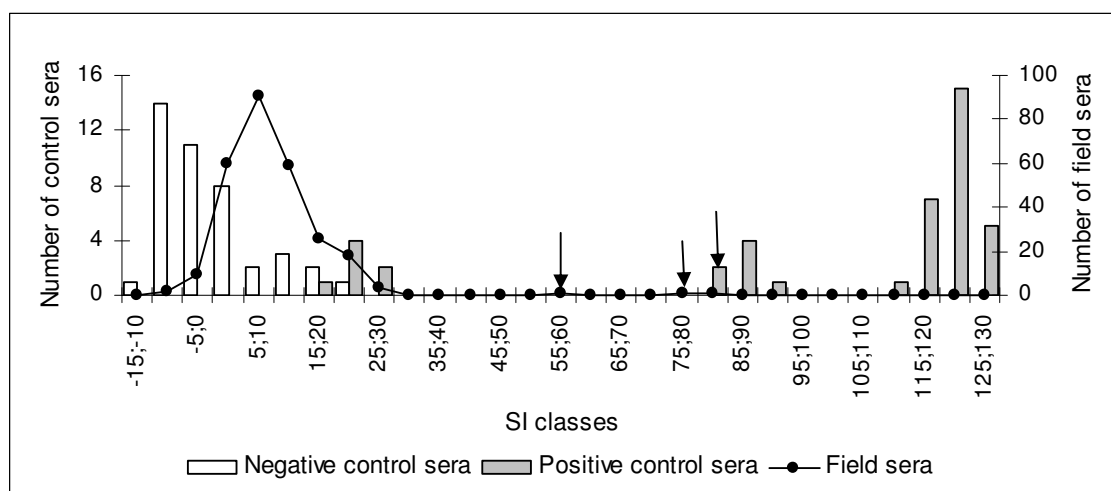


Figure 36 : Répartition des sérums de porc domestique selon les valeurs des Indices sérologiques

3 sérums (indiqués en flèches noires) sont considérés comme positifs.

4. Discussion

Le potamochère est probablement le moins étudié de tous les réservoirs sauvages potentiels de la PPA en Afrique. Ses rôles écologique (virus de la PPA) et épidémiologique (maladie de la PPA) sont peu documentés. A Madagascar, cette incertitude est encore plus grande puisque la réceptivité et la sensibilité du potamochère malgache vis-à-vis du virus de la PPA pourraient être différentes de celles décrites en Afrique continentale en raison de l'introduction récente du virus dans les agro-écosystèmes malgaches. Nos études ont fourni des informations sur la PPA chez cette espèce : certes, elles sont limitées mais elles sont néanmoins utiles. En outre, les analyses des prélèvements de potamochères réalisées dans les différents laboratoires de référence (en Espagne et à Montpellier) confirment la validité des résultats.

Nous pouvons ainsi assurer que la prévalence de la PPA chez les potamochères malgaches est inférieure à 8%, avec un intervalle de confiance de 95%. En effet, notre échantillon était faible et était établi pour détecter une prévalence supérieure à 8%. Il est par conséquent difficile, à ce stade, de conclure sur la non-circulation du virus PPA au sein des populations de potamochères.

Bien que le dépistage non systématique des échantillons (des sérums et des tissus) de potamochères pendant les premiers mois de l'introduction du virus dans la grande île entre 1998 et 2000, n'ait jamais donné des résultats positifs (**Roger, communication personnelle**), nos résultats semblent confirmer ce modèle et suggérer que les potamochères malgaches ne jouent pas jusqu'à présent un rôle important dans le cycle de la PPA : ce rôle pourrait être nul.

Dans le cas du sanglier dans le milieu méditerranéen, il a été démontré que la maladie tend à disparaître chez la population des porcs sauvages en absence de réinfection par des contacts avec les porcs en divagation infectés (**Laddomada et al, 1994 ; Perez et al, 1998**).

Dans la zone de Marovoay et dans la région de Mahajanga, le virus de la PPA a été isolé chez les porcs en 2002. Par la suite, plusieurs foyers de maladie ont été rapportés par des éleveurs en 2005, sans toutefois être confirmés par des résultats de laboratoire. Cependant, vue l'endémicité de la PPA et l'existence de la survenue d'épidémies dans cette région au cours de ces dernières années, en supposant la réceptivité des espèces de *Potamochoerus* au virus de la PPA, et la présence de contacts entre potamochères et porcs domestiques en divagation rapportée dans la région (**Goutard, 1999**), en effet, le risque de la transmission du virus à des potamochères existe.

D'ailleurs, en dépit de la présence d'*O. porcinus spp* depuis le XVIIIème siècle (**Drury, 1720 ; Lamoureux 1913 ; Néél, 1949**) dans la région Nord-Ouest de l'île et la zone de

Marovoay, les contacts entre les potamochères et les tiques molles semblent peu probables et ceci est confirmé par nos résultats. Ces contacts sont peu susceptibles de se produire puisque les potamochères ne vivent pas dans des terriers. A noter cependant qu'ils construisent des nids à partir de tas d'herbe dans les zones de végétation dense (**Vercammen et al, 1993**) et que l'occurrence des tiques dans ces nids n'a jamais été étudiée jusqu'à présent (**Penrith et al, 2004**). Dans tous les cas, aucune preuve de contact n'a été trouvée entre les argasidés et les potamochères au cours de notre étude. Par conséquent, le rôle d'*O. porcinus spp* semble se limiter à la persistance du virus de la PPA dans certains agrosystèmes (élevages traditionnels). Les potamochères peuvent entrer en contact avec des porcs domestiques infectés (malades, porteurs) soit directement, soit indirectement via des produits carnés issus d'une carcasse infectée. Cette hypothèse semble plausible dans la zone dans laquelle des échantillons de potamochères ont été prélevés et où il existe des porcs en divagation. Le contact entre ces deux espèces de suidés est possible si l'on considère l'existence d'hybrides issus du croisement entre porc domestique et potamochère. De tels contacts ont été régulièrement rapportés par des éleveurs dans cette zone (**Jori et Bastos, 2009b**).

Selon le Tableau 4, avec une taille d'échantillon fixé à 35 individus, la probabilité de non détection augmente progressivement alors que la prévalence estimée diminue. Par conséquent, les prochaines études visant à détecter le virus de la PPA chez les potamochères en Afrique ou à Madagascar devraient se baser sur des tailles d'échantillon plus importantes.

Tableau 4: Probabilité de non détection du virus de la PPA

| Prévalence estimée (%) | Probabilité de détection (P) | Probabilité de non détection (1-P) | Taille de l'échantillon | Pourcentage de l'échantillon (%) |
|------------------------|------------------------------|------------------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| 8 | 0.95 | 0.05 | 36 | 0,20 |
| 5 | 0.83 | 0.17 | 59 | 0.33 |
| 3 | 0.65 | 0.35 | 97 | 0.54 |
| 2 | 0.5 | 0.5 | 148 | 0.82 |
| 1 | 0.29 | 0.71 | 296 | 1.64 |

Dans ce tableau, cette probabilité dépend de la prévalence estimée dans une population de 18000 potamochères, avec un intervalle de confiance à 95%.

Etudier les potamochères dans d'autres régions d'Afrique est difficile du fait de leur nature craintive et de leurs habitudes nocturnes. Ces contraintes pourraient partiellement être résolues à Madagascar au travers d'une collaboration avec les acteurs impliqués dans la chasse et le commerce de viande de potamochère. Des efforts plus importants pourraient ainsi être fournis afin d'obtenir un échantillon de plus grande taille dans le cadre de l'étude de la PPA et d'autres maladies porcines dans cette espèce (PPC, etc....).

Notre étude rapporte les premiers résultats de l'utilisation d'un test sérologique (ELISA indirect) pour estimer l'aire de distribution du vecteur biologique de la PPA à Madagascar. Cette technique a été employée avec succès à grande échelle dans la péninsule ibérique pour la localisation d'*O. erraticus* (Oleaga-Perez et al, 1994) et l'évaluation de son rôle dans la persistance du virus de la PPA en Espagne (Perez-Sanchez et al, 1994). La détection d'anticorps anti-tique *O. moubata* dans les 3 sérums de porc positifs (1,1%) et les 106 sérums douteux (39,1 %), prélevés dans différentes régions du Madagascar semble suggérer un contact entre les porcs et les tiques molles dans les zones d'étude, bien que la recherche de tiques, dans les porcheries où ont été prélevés ces sérums positifs et douteux, ait donné un résultat négatif. Nos résultats suggèrent ainsi que les contacts entre les porcs et les tiques molles existent et pourraient être plus fréquents et répandus que prévus.

En dépit des résultats non validés par la recherche de tiques molles dans les porcheries où les sérums positifs ou douteux avaient été trouvés, ce test ELISA détectant les anticorps anti-tique *O. moubata* semble être un outil utile pour déterminer la distribution des vecteurs invertébrés de la PPA à Madagascar. D'autres travaux sont nécessaires afin de valider ce test ELISA dans les conditions naturelles. Il pourra être par la suite utilisé pour étudier la distribution des tiques *O. porcinus spp* dans toute l'île.

Nos résultats suggèrent que le cycle sauvage du virus de la PPA à Madagascar est différent de celui décrit en Afrique australe (Thomson, 1985) ou en Afrique de l'ouest (Vial et al, 2007). Les potamochères malgaches semblent jouer, actuellement, un rôle épidémiologique négligeable, voire nul. Cependant d'autres études incluant un plus grand nombre d'échantillons demeurent nécessaires pour estimer la circulation ou l'absence de la PPA chez les potamochères. Le cycle sauvage de la PPA à Madagascar est susceptible d'être limitée à un cycle de porc domestique et tique molle dans les zones où les tiques sont actuellement présentes.

Des recherches complémentaires sont nécessaires pour préciser la distribution et la capacité vectorielle des tiques molles.

5. Conclusion

Nos résultats suggèrent que les potamochères malgaches sont différents de ceux décrits en Afrique australe (**Thomson, 1985**) en ce qui concerne leur implication dans l'épidémiologie de la PPA : ils semblent jouer un rôle négligeable. Pour pouvoir conclure si le virus ne circule pas du tout chez les potamochères, il faudra augmenter la taille de l'échantillon à étudier, et ce malgré la difficulté de la capture de potamochères.

Les tiques molles *O. porcinus spp* n'ont apparemment pas de contact avec les potamochères et l'infection des potamochères se produirait plutôt par des contacts avec les porcs domestiques. L'existence de porcs hybrides, signalée à plusieurs reprises par des éleveurs, en particulier dans la zone de Marovoay, confirme la réalité de ces contacts.

L'analyse de quelques sérums de porcs indique qu'il existait probablement un contact entre certains porcs domestiques et les tiques *O. porcinus spp* quoique les résultats de recherche de ces tiques molles dans les porcheries aient été négatifs.

**TROISIEME PARTIE : ANALYSE DE RISQUE
DE TRANSMISSION DU VIRUS DE LA PPA AU
PORC DOMESTIQUE PAR LES HÔTES
SAUVAGES A MADAGASCAR**

1. Introduction

1.1. Rappel

Le virus de la peste porcine africaine ou PPA a été introduit à Madagascar en 1997 et a engendré de nombreuses pertes économiques extrêmement importantes (**Rousset et al, 2001**) : taux de mortalité des porcs élevé, abattage sanitaire, diminution brusque de la production porcine et profonde désorganisation de la filière porcine. En outre, la présence dans le pays d'hôtes sauvages potentiellement infectés par la PPA tels que la tique molle (*O. porcinus spp*) et le potamochère (*P.larvatus*) pourrait représenter un danger d'endémisation du virus dans le territoire malgache et rendre difficile le contrôle et l'éradication de la maladie.

1.2. Définitions

Différents termes utilisés en analyse de risque méritent d'être connus pour une meilleure compréhension de cette étude. Des définitions ont été fournies par l'OIE (**OIE, 2007**).

- **L'analyse de risque** est une méthode d'aide à la décision qui comprend l'identification du danger, l'appréciation du risque, la gestion du risque et la communication sur le risque.
- **Le risque** se définit comme étant la « probabilité de la survenue d'un danger, combinée à l'importance de ses conséquences indésirables ».
- **Le danger** représente tout agent biologique, physique ou chimique pouvant avoir un effet néfaste pour la santé du sujet en question.
- **L'appréciation de l'émission** est l'étape qui consiste à apprécier la probabilité d'émission, c'est-à-dire la probabilité de production du danger à partir de sa source.
- **L'appréciation de l'exposition** est une étape consistant à apprécier la probabilité d'exposition, c'est-à-dire la probabilité pour des animaux ou des êtres humains d'être exposés au danger.
- **L'appréciation des conséquences** est l'étape qui consiste à décrire les résultats de la survenue du danger.
- **L'appréciation du risque** est l'étape générale de l'analyse du risque permettant d'aboutir à la valeur (qualitative, décrite par des mots ou par une échelle ordinale, ou quantitative, décrite par des valeurs chiffrées) du risque. Selon l'OIE, elle se compose de quatre étapes : l'appréciation de l'émission, l'appréciation de l'exposition, l'appréciation des conséquences et l'estimation du risque.

2. Objectifs

L'estimation des risques d'introduction de la PPA peut permettre de cibler les efforts de surveillance et d'identifier les facteurs spécifiques qui permettent un meilleur contrôle. L'identification des diverses voies possibles d'introduction du virus, basée sur des expériences antérieures et sur une analyse systématique du modèle conceptuel épidémiologique de la PPA à Madagascar, accentue l'importance des mesures actives et passives de surveillance ainsi que de biosécurité.

Afin d'élaborer les objectifs spécifiques de cette étude, il nous fallait définir le risque portant sur « **la probabilité d'introduction du virus de la PPA circulant à Madagascar dans un cheptel de porcs domestiques de toutes races, à partir des tiques et/ou des potamochères, existant dans trois zones d'étude durant les années 2006 à 2008** ».

Afin d'estimer ce risque, la « méthode d'appréciation du risque » préconisée par l'organisation mondiale de la santé animale (OIE) en 2007 a été choisie. L'approche qualitative a été utilisée dans cette étude car beaucoup de données quantitatives manquent (Dufour et Pouillot, 2002). Cette méthode utilise des termes qualitatifs pour l'appréciation du risque et non des chiffres. Les zones d'étude sont toujours les zones de Marovoay, d'Ambatondrazaka, d'Antananarivo-Mahitsy et d'Antananarivo-Arivotrimamo.

3. Méthodologie

La méthode utilisée dans cette étude est donc celle préconisée par l'OIE en 2007 (OIE, 2007), qui comporte quatre composantes interconnectées: l'identification du danger ; l'appréciation du risque d'introduction du virus de la PPA chez les porcs domestiques à partir des hôtes sauvages à Madagascar ; la gestion du risque ; et la communication relative à ce risque, visant à donner des recommandations aux autorités et aux différents acteurs concernés (Figure 37).

Il faut noter qu'à chaque type de danger correspond une analyse de risque. Dans notre cas, le danger est représenté par l'agent pathogène qui est le virus de la PPA.

Le cadre du travail se limitera à la description de « **l'appréciation du risque** » qui est particulièrement scientifique. La gestion et la communication relative au risque sont généralement plutôt d'ordre administratif et politique. Néanmoins des propositions sur la gestion de risque pourront être évoquées dans cette étude.

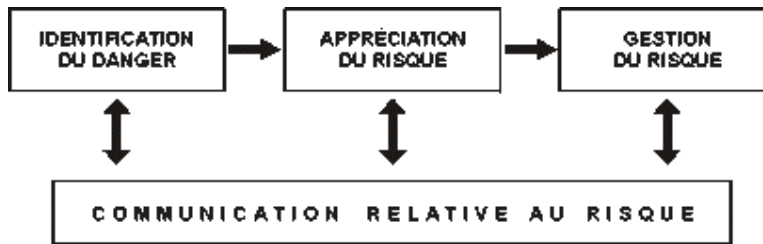


Figure 37 : Méthode d'analyse de risque selon l'OIE (OIE, 2007)

L'appréciation du risque est composée de différentes étapes :

3.1. L'appréciation de l'émission

Elle consiste à approcher de manière qualitative la probabilité de présence du virus de la PPA et d'hôtes sauvages dans les zones d'études et les possibilités de transmission du virus via des contacts entre des porcs susceptibles et des hôtes sauvages infectés. Cette probabilité dépend surtout de la prévalence d'infection des tiques et des potamochères dans la zone étudiée.

3.2. L'appréciation de l'exposition

Cette appréciation consiste à approcher qualitativement la probabilité pour les porcs d'être exposés au danger considéré.

3.3. L'appréciation de la probabilité de survenue ou émergence du danger

Elle est constituée par la combinaison de la probabilité de l'émission et de la probabilité de l'exposition. Elle a été déterminée par neuf termes qualificatifs (Tableau 5)

Tableau 5 : Nouvelle grille de qualificatifs utilisés pour l'appréciation de la probabilité de survenue (AFSSA, 2008)

| Echelle ordinale | Qualificatifs |
|------------------|-------------------------|
| 0 | Nulle (N) |
| 1 | Quasi-nulle (QN) |
| 2 | Minime (M) |
| 3 | Extrêmement faible (EF) |
| 4 | Très faible (TF) |
| 5 | Faible (F) |
| 6 | Peu élevée (PE) |
| 7 | Assez élevée (AE) |
| 8 | Elevée (E) |
| 9 | Très élevée (TE) |

3.3.1. Principes de croisement des probabilités de l'émission et de l'exposition

La probabilité de survenue de l'évènement étant une probabilité conditionnelle qui correspond à la combinaison entre la probabilité de l'émission et la probabilité de l'exposition, il était nécessaire de mettre au point des modalités de combinaison entre les qualificatifs résultant de l'estimation de l'émission et ceux résultant de l'estimation de l'exposition. Des règles de croisement des qualificatifs ont donc été recherchées. Pour établir le tableau de croisement proposé (Tableau 6), quelques règles simples ont été utilisées (AFSSA, 2008).

- une probabilité qualifiée de « nulle » combinée avec n'importe quelle autre probabilité conduit la probabilité résultante à être également « nulle » ;
- en dehors de toute combinaison avec une probabilité qualifiée de « nulle », la plus faible probabilité possible est « quasi-nulle » ;
- le croisement de deux qualificatifs conduit à un résultat identique ou, le plus souvent, inférieur au qualificatif le plus faible des deux ;
- le tableau de croisement est strictement symétrique suivant une diagonale ;
- il respecte la logique de progression des qualificatifs au sein d'une même ligne et d'une même colonne.

Tableau 6 : Résultats du croisement entre probabilité d'émission et probabilité d'exposition (AFSSA, 2008)

| | | Probabilité d'émission | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|----|------------------------|---|---|----|---|----|----|---|----|----|---|----|
| | | | | N | QN | M | EF | TF | F | PE | AE | E | TE |
| | | | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| Probabilité d'exposition | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | QN | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | M | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | EF | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | TF | 4 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 |
| | F | 5 | 0 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 |
| | PE | 6 | 0 | 1 | 2 | 2 | 3 | 4 | 5 | 5 | 6 | 6 | 6 |
| | AE | 7 | 0 | 1 | 2 | 3 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 7 | 7 |
| | E | 8 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 8 | 8 |
| | TE | 9 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 8 | 9 |

Les qualificatifs utilisés dans ce tableaux sont :

N=Nulle, QN=Quasi-nulle, M=Minime, EF=Extrêmement faible, TF=Très faible, F=Faible, PE=Peu élevée, AE=Assez élevée, E=Elevée, TE= Très élevée

3.3.2. Règles pour les probabilités cumulées (AFSSA, 2008)

Dans certains cas, une probabilité (émission ou exposition) est le résultat cumulé de plusieurs probabilités. Si l'on s'intéresse à la probabilité d'introduire le virus de la PPA dans une zone, celle-ci peut se faire à la fois à partir de la transmission vectorielle (la tique molle infectée) et par l'intermédiaire de contact avec le potamochère infecté. La probabilité résultante correspond alors au cumul de ces deux probabilités. En appréciation qualitative, si les possibilités estimées sont de niveaux différents, on retiendra que la probabilité résultante

correspond au niveau le plus élevé de chacune des probabilités, et non pas à l'addition de chacun des niveaux. Dans le cas où les probabilités estimées sont de même niveau, le qualificatif résultant peut éventuellement être le qualificatif immédiatement supérieur aux deux probabilités. Ainsi, si l'on doit cumuler deux probabilités estimées « élevées » (niveau 8 sur une échelle de 0 à 9), la probabilité résultante peut être estimée « très élevée » (niveau 9 sur une échelle de 0 à 9 dans le tableau précédent, Tableau 5)

3.4. L'appréciation des conséquences

Elle consiste à décrire les effets néfastes de la survenue du danger. Il peut s'agir de conséquences directes ou indirectes. Nous pouvons citer trois types de conséquences de l'introduction du virus de la PPA à Madagascar :

- les conséquences sanitaires et économiques pour un élevage de porcs telle une mortalité élevée des animaux, une chute de production, une baisse des revenus de l'éleveur.
- la « diffusibilité » de la maladie dans chaque cheptel, dans d'autres élevages ainsi que dans d'autres régions du pays voire dans presque toute l'île. Cette conséquence peut être à l'origine d'une situation enzootique du pays vis-à-vis de cette maladie.
- les conséquences nationale et internationale de la maladie surtout du point de vue économique après l'introduction du virus dans le pays.

Le risque étant le produit de la probabilité de survenue d'un événement par ses conséquences, dans toute appréciation du risque, il convient d'apprécier l'importance des conséquences de la survenue du danger.

Afin de prendre en compte les différentes composantes des conséquences de la manière la plus précise tout en restant dans le domaine de l'approche qualitative, ces composantes ont été déclinées en trois critères et pour chaque critère, une échelle semi-quantitative (arithmétique) à quatre niveaux a été retenue pour rationaliser l'appréciation. Ces quatre niveaux correspondent à une note comprise entre 0 (pour l'absence de conséquences) et 3 (pour les conséquences élevées) telles que présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 7), (**AFSSA, 2008**).

Tableau 7 : Notation proposée pour l’appréciation de chacun des critères des conséquences (AFSSA, 2008)

| Note | Correspondance qualitative |
|------|--|
| 0 | Les conséquences pour le critère sont estimées <u>nulles</u> |
| 1 | Les conséquences pour le critère sont estimées <u>faibles</u> |
| 2 | Les conséquences pour le critère sont estimées <u>moyennes</u> |
| 3 | Les conséquences pour le critère sont estimées <u>élevées</u> |

L’appréciation des conséquences de la maladie peut se présenter ainsi sur une échelle arithmétique totale de 9 (Tableau 8) : pour chacun des trois critères nécessaires à l’appréciation, après une argumentation précise, il convient d’indiquer le niveau d’importance des conséquences entre 0 et 3 afin d’aboutir à un total sur 9 pour la maladie considérée, qui est la PPA dans cette présente étude

Tableau 8 : Critères d’appréciation des conséquences en santé animale (AFSSA, 2008)

| Maladie | Conséquences sanitaires et économiques pour un élevage | Diffusibilité de la maladie | Répercussions économiques nationales et/ ou internationales | Conséquences cumulées pour la santé animale |
|--------------------------------|--|-----------------------------|---|---|
| Peste porcine africaine | 0 à 3 | 0 à 3 | 0 à 3 | 0 à 9 |

Les chiffres 0 à 9 correspondent toujours aux qualificatifs proposés dans le précédent (Tableau 5).

3.5. L’estimation du risque

Il convient d’envisager comment combiner une probabilité qualitative de survenue avec une appréciation qualitative des conséquences. Pour la présente étude, il s’agit d’une part de la combinaison de probabilité de survenue du danger croisée avec les conséquences à travers les tiques et d’autre part à travers les potamochères, qui donne l’estimation du risque en général. L’intégration des conséquences dans l’approche qualitative du risque est une étape qui, même

si elle est délicate, est importante. En effet, sans cette étape il est impossible de qualifier le risque global.

Trois principes permettant d'aboutir à un tableau de croisement (Tableau 9) ont été proposés :

- Pour des conséquences de 1 à 3 (estimées : « quasi-nulles », « minimales » ou « extrêmement faibles ») les règles de croisement minorent le risque.
- Pour des conséquences de 4 à 6 (estimées : « très faibles », « faibles » et « peu élevées », le poids des conséquences et de la probabilité de survenue est équilibré.
- Pour des conséquences de 7 à 9 (estimées : « assez élevées », « élevées » et « très élevées ») les règles de croisement majorent le risque.

Tableau 9 : Estimation qualitative du risque résultant du croisement de l'estimation qualitative de la probabilité de survenue (colonne) et de l'estimation qualitative des conséquences (ligne), (AFSSA, 2008)

| | | <u>Probabilité de survenue</u> | | | | | | | | | | | |
|---------------------|-----|--------------------------------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | | | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| | | | | N | QN | M | EF | TF | F | PE | AE | E | TE |
| <u>Conséquences</u> | 0 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N |
| | 1-3 | QN | N | QN | QN | QN | QN | QN | QN | QN | QN | QN | QN |
| | | M | N | QN | QN | QN | QN | QN | QN | QN | QN | QN | M |
| | | EF | N | QN | QN | QN | QN | QN | QN | QN | M | EF | |
| | 4-6 | TF | N | QN | QN | QN | M | M | EF | EF | TF | TF | |
| | | F | N | QN | M | M | EF | EF | TF | TF | F | F | |
| | | PE | N | M | EF | EF | TF | TF | F | F | PE | PE | |
| | 7-9 | AE | N | F | F | F | PE | PE | PE | AE | AE | AE | |
| | | E | N | PE | PE | PE | AE | AE | AE | E | E | E | |
| | | TE | N | AE | AE | AE | E | E | E | TE | TE | TE | |

L'appréciation du risque doit être conduite sur la base des données disponibles les plus précises possible et respecter la succession des étapes suivantes :

- Identification des paramètres indispensables à **l'appréciation de l'émission** : le danger est constitué par l'agent pathogène c'est-à-dire le virus de la PPA dont il faut définir les caractéristiques (virulence, résistance, mode de transmission, mode de réplication etc....).

En outre, la tique *O. porcinus spp* et le potamochère *Potamochoerus larvatus* jouent le rôle de vecteur et/ou de réservoir. Leurs caractéristiques doivent être également connues. Pour les tiques, il s'agit de la préférence trophique, de la capacité vectorielle, de la durée de vie, de la durée de gorgement ainsi que de leur écologie. Pour les potamochères, il faut également connaître l'espèce, le degré de résistance au virus, la durée de virémie, la pathogénie, la capacité d'hybridation avec les porcs domestiques, leur écologie, la dynamique de la population, les domaines vitaux ou les territoires et le taux d'infection par le virus ou la prévalence.

- Identification des paramètres indispensables à **l'appréciation d'exposition** : il s'agit de définir pour le porc domestique sa race, sa sensibilité, son statut immunitaire, ses domaines vitaux etc....

- Identification des paramètres indispensables à **l'appréciation des conséquences** : il s'agit des conséquences sanitaires et économiques pour un élevage, de la diffusibilité de la maladie entre troupeaux et des conséquences économiques nationales et internationales de la maladie (essentiellement les contraintes commerciales).

La méthode de l'appréciation du risque est résumée dans la Figure 38 ci-dessous :

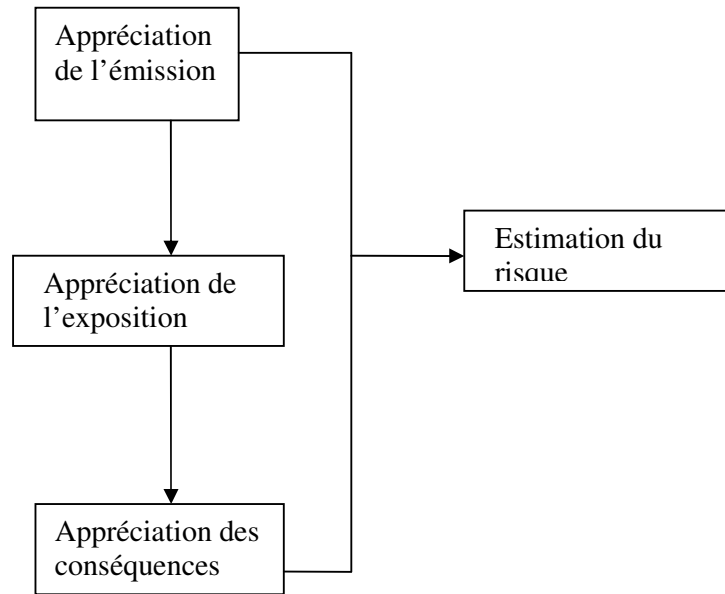


Figure 38 : Méthode d'appréciation du risque selon l'OIE (2007)

4. Résultats

4.1. Identification du danger et définition du risque

Le virus de la PPA est présent dans la grande île depuis 1997 (**Gonzague et al, 2001**). Les tiques molles et les potamochères sont des hôtes sauvages du virus de la PPA en Afrique (**Thomson et al., 1980**). A Madagascar, les tiques molles du genre *O. porcinus spp* ont été observées depuis le début du XX^{ème} siècle (**Lamoureux, 1913, Suldey 1916**) et le potamochère du genre *Potamochoerus larvatus* occupe le territoire malgache depuis environ 2000 ans (**Andrianjakarivelo, 1999**).

Nous allons considérer le risque pour les porcs domestiques de s'infecter avec le virus de la PPA à partir des hôtes sauvages. Une seconde approche aurait pu être d'étudier la possibilité pour les tiques molles et les potamochères malgaches de s'infecter avec le virus de la PPA à partir des porcs domestiques. Dans les deux cas, le danger est toujours représenté par le virus de la PPA. Néanmoins dans la présente étude, nous nous limiterons au risque d'infection des porcs domestiques à partir du réservoir sauvage.

4.2. Appréciation du risque de transmission du virus de la PPA aux porcs domestiques par les tiques molles

4.2.1. Construction de modèles événementiels ou « Pathways » d'introduction du virus de la PPA par les tiques molles

La construction de modèles événementiels est l'étape dans l'analyse de risque qui permet de représenter schématiquement les différents événements qui aboutissent à l'apparition du risque (OIE, 2004).

4.2.1.1. Modèle événementiel de l'émission

Le modèle (

Figure 39) a été construit en prenant en compte les hypothèses suivantes :

Il faut que la tique molle *O. porcinus spp* soit présente dans la zone étudiée (avec un taux d'infestation connu), qu'elle (adulte ou nymphe) soit infectée par le virus de la PPA (avec un taux d'infection connu) et qu'elle soit infectante (avec une quantité de virus suffisante).

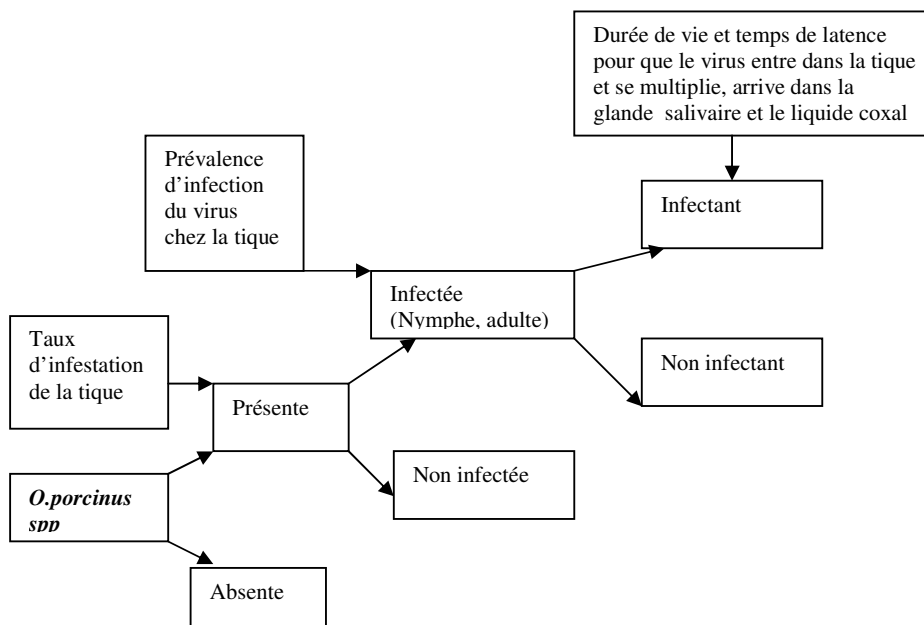


Figure 39 : Modèle événementiel de l'émission du virus de la PPA par la tique molle
Ornithodoros porcinus spp

4.2.1.2. Modèle événementiel de l'exposition

Le modèle événementiel de l'émission du virus est suivi directement du modèle événementiel de l'exposition (Figure 40). Il concerne le porc domestique sain et considère deux évènements :

- qu'il soit en contact avec la tique infectée,
- et qu'il devienne infecté

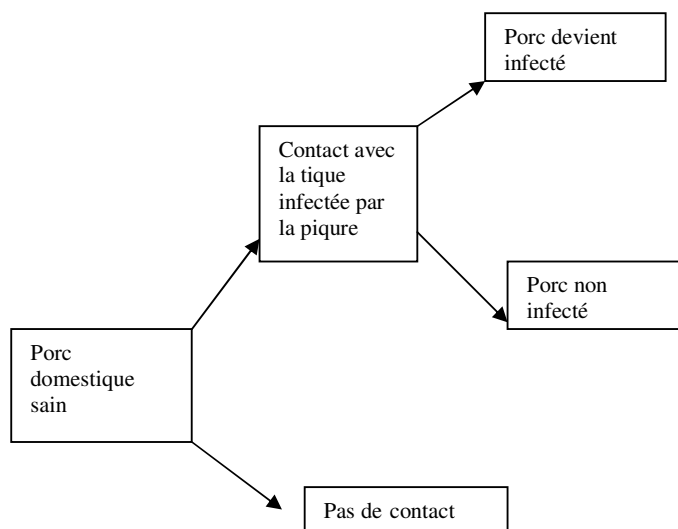


Figure 40 : Modèle événementiel de l'exposition du porc domestique sain à la tique molle infectée

4.2.2. Appréciation de la probabilité d'émission du virus par les tiques molles

La probabilité d'émission (ou d'introduction) du virus de la PPA par l'intermédiaire des tiques molles *O. porcinus spp* a été caractérisée en croisant la probabilité de tous les évènements qui la constituent, c'est-à-dire la probabilité de la présence des tiques dans les zones étudiées avec la probabilité que l'une d'elles soit infectée et avec la probabilité qu'elle soit infectante.

4.2.2.1. Probabilité de présence de la tique molle *O. porcinus spp* dans les zones étudiées

La présence de cette tique molle a été enregistrée dans la zone Ouest et Nord-Ouest de Madagascar par différents auteurs depuis le début du XX^{ème} siècle (**Lamoureux 1913 ; Néel 1949**). Cependant, depuis les années 60, aucune tique n'a été signalée dans ces zones. En outre, une récente recherche conduite par Roger dans la zone de Marovoay durant les premières épidémies de la PPA (en 1999) n'a révélé aucune présence de tiques (**Roger, communication personnelle**).

Nos collectes de tiques molles dans les porcheries de cette zone ont donné un résultat négatif quoique le résultat du test ELISA anti-tique ait indiqué un contact éventuel entre les tiques molles et les porcs domestiques (**Ravaomanana et al, 2010**). Plusieurs facteurs ont été suggérés pour la disparition ou la quasi-extinction de la tique molle dans cette zone (cf. paragraphe discussion sur les tiques molles).

En se basant sur ces résultats et ces éléments, la probabilité de trouver une tique molle dans la zone de Marovoay a été caractérisée comme «faible », ou (F), correspondant à 5 sur l'échelle ordinale (Tableau 5).

Les mêmes espèces de tiques ont été signalées dans des porcheries dans la zone du Moyen-Ouest de Madagascar, à Mahasolo, à 150 km de la capitale par différents auteurs en 1963, en 1979 et en 1988 (**Uilenberg, 1963 ; Uilenberg, 1979 ; Fontenille, 1988**). A partir de ces dates, toutes les recherches ont échoué dans la détection de tiques (**F. Rodhain, 1989**).

Dans la zone d'Antananarivo-Arivotrimamo, zone située à 100 km de Mahasolo, des recherches de tiques molles dans des porcheries effectuées dans le cadre de notre étude ont été négatives, malgré la similarité des structures des porcheries dans cette zone avec celle infestée par les tiques à Antananarivo-Mahitsy. Selon les résultats du test ELISA anti-tique, il n'existait aucun contact entre les tiques molles et les porcs dans cette zone. Compte tenu de ces résultats, la probabilité de trouver une tique dans cette zone étudiée est classée qualitativement comme « extrêmement faible », ou (EF), correspondant à 3 sur l'échelle ordinale (Tableau 5).

Par contre, la recherche effectuée par Roger en 2000 (**Roger et al, 2001**) a révélé la présence des tiques molles *O. porcinus spp* dans une porcherie à Mahitsy dans la zone d'Antananarivo. Ce résultat a été confirmé par notre étude. Cependant, dans les autres porcheries visitées au voisinage de la porcherie infestée, aucune tique n'a été trouvée, ce qui peut être relié au mode de vie sédentaire de cette tique et à sa capacité de dispersion faible. Les conditions climatiques sont froides dans la zone des Hauts-plateaux où les tiques ont été collectées en

2000 et en 2007-2008. Ceci peut expliquer leur localisation réduite à une porcherie où elles devaient trouver un microclimat favorable à leur développement et un micro-habitat approprié à leur cycle de vie (**Morel, 1969**).

Dans ce cas, nous pouvons caractériser la probabilité de trouver une tique dans la zone d'Antananarivo-Mahitsy par le qualificatif « peu élevée » ou (PE), correspondant à 6 sur l'échelle ordinale (Tableau 5).

Dans la zone d'Ambatondrazaka, aucune étude n'a signalé jusqu'à présent la présence de ces tiques molles. Ce constat a été également confirmé par nos investigations dans plusieurs fermes (cf. chapitre II « rôle des tiques molles » dans la deuxième partie). Ainsi, la probabilité de trouver une tique dans cette zone est caractérisée comme « quasi-nulle » ou (QN), correspondant à la valeur 1 sur l'échelle ordinale (Tableau 5).

Le tableau suivant résume ces résultats.

Tableau 10 : Résumé de l'appréciation de la probabilité de la présence des tiques molles *Ornithodoros porcinus spp* dans les zones d'étude

| Zones d'étude | Probabilité estimée de la présence des tiques molles | Echelle ordinale |
|--------------------------|--|------------------|
| Marovoay | Faible (F) | 5 |
| Antananarivo-Arivonimamo | Extrêmement faible (EF) | 3 |
| Antananarivo-Mahitsy | Peu élevée (PE) | 6 |
| Ambatondrazaka | Quasi-nulle (QN) | 1 |

4.2.2.2. Probabilité d'infection de la tique molle *O. porcinus spp*

Les taux d'infection du virus de la PPA chez les tiques molles collectées en 2000 et en 2007-2008 se situent entre 9,52% et 6,83% (**Ravaomanana et al, 2010**). Ce sont les tiques molles adultes et les nymphes qui ont été trouvées infectées. Cependant, comme la transmission du

virus d'une tique à une autre est trans-stadiale, transovarienne et sexuelle, la probabilité de transmettre le virus d'une tique à une autre est considérée comme « assez élevée ». C'est à partir de ces résultats que l'appréciation de la probabilité pour qu'une tique soit infectée a été caractérisée. Cette probabilité a été appréciée comme «assez élevée » ou (AE).

Cette probabilité représente donc l'appréciation de la probabilité d'infection de la tique dans la zone d'Antananarivo-Mahitsy et peut être aussi valable pour les autres zones dans lesquelles le virus de la PPA circule car, quelles que soient les zones de Madagascar où les tiques sont présentes, elles se concentrent toujours dans le milieu où elles peuvent trouver le micro-habitat et le microclimat appropriés à leur mode de vie. Par conséquent, le mode de transmission du virus chez les tiques ne change pas. De ce fait, la prévalence de la PPA chez les tiques dans les zones infectées ne pourrait pas être très différente de celle trouvée dans la zone d'Antananarivo-Mahitsy.

4.2.2.3. Probabilité pour que la tique molle *O. porcinus spp* soit infectante

Expérimentalement, le titre du virus dans la glande salivaire et le tissu des gonades est environ de 10^4 à 10^6 HAD50/mg chez *Ornithodoros moubata* (Kleiboeker, 1998) tandis que sur le terrain la quantité du virus trouvé dans les tiques infectées est plus faible, au maximum $10^{4.3}$ HAD50/tique (Basto et al, 2006 ; Boinas, 1995). L'infection se fait par excrétion d'une certaine quantité de virus lors du repas sanguin des tiques molles sur les porcs domestiques. La tique excrète le virus dans le fluide coxal, les excréments malpighiens, les sécrétions salivaires et les sécrétions génitales femelles (Plowright et al, 1974 ; Greig, 1972). Les cellules épithéliales phagocytaires digestives sont le site initial de la réplication virale. Elles présentent la quantité maximale du virus 28 jours après l'infection (Kleiboeker, 1998).

A partir de ces études nous avons qualifié comme « assez élevée » la probabilité pour qu'une tique soit infectante.

Dans le tableau suivant (Tableau 11) sont résumées les probabilités des différents évènements qui constituent la probabilité de l'émission du virus de la PPA par les tiques molles.

Tableau 11 : Résumé des probabilités de différents évènements constituant la probabilité de l'émission du virus par les tiques molles

| Probabilités | La tique soit présente | La tique soit infectée | La tique soit infectante |
|------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Qualificatif | « peu élevée » (PE) | «assez élevée » (AE) | « assez élevée » (AE) |
| Echelle ordinale | 6 | 7 | 7 |

La probabilité de l'émission par les tiques molles a été caractérisée en croisant toutes ces probabilités présentées dans le tableau 11, selon la règle de croisement du tableau 6 : $P = (PE) * (AE) * (AE) = (TF)$

La probabilité de l'émission du virus par les tiques molles a été donc appréciée comme « très faible » ou (TF), correspondant à 4 sur l'échelle ordinale (Tableau 5).

4.2.3. Probabilité de l'exposition du porc au virus via la tique molle

Pour estimer cette probabilité, deux hypothèses suivantes ont été prises en considération simultanément :

- le porc sain est en contact avec la tique,
- le porc devient infecté sachant que la tique est infectante (cf. probabilité d'émission)

La probabilité de l'exposition a été caractérisée à partir du résultat de croisement des probabilités de ces évènements.

4.2.3.1. Probabilité pour qu'un porc sain soit en contact avec la tique infectée

Les tiques molles ont été trouvées généralement dans les fissures, les fentes et les crevasses des murs dans les porcheries traditionnelles. Par contre, elles sont absentes dans les porcheries modernes. La caractéristique biologique principale des tiques molles est la courte durée du repas sanguin : elle est en moyenne de 15 à 60 minutes selon les espèces. Chez les

Ornithodoros, le repas sanguin est important surtout chez les femelles adultes pour qu'elles puissent pondre leurs œufs. Les tiques molles ont d'ailleurs développé une stratégie physiologique pour favoriser une prise du sang plus rapide chez l'hôte (**Morel, 1969**).

Ces tiques particulièrement sédentaires sont généralement monotropes. Elles restent habituellement toute leur vie à proximité immédiate de leur hôte. La présence d'un porc ne leur échappe pas : elles sont guidées par le CO₂ émis par l'hôte et par la chaleur qu'elles perçoivent par l'organe de Haller (**Morel, 1969**).

Pour détecter l'éventuel contact entre les tiques molles et les porcs domestiques, le test ELISA anti-tique *O. moubata* développé en Espagne (**Canals et al, 1990**) a été utilisé à Madagascar dans les trois zones d'étude. Selon les résultats obtenus parmi les 271 individus analysés : 106 porcs (39,1 %) ont été trouvés douteux (contact éventuel avec une tique) et 3 porcs (1,1%) positifs avec un contact réel avec les tiques molles (**Ravaomanana et al, 2010**).

D'après ce résultat du test ELISA anti-tique, la probabilité de contact entre la tique molle et le porc domestique a été appréciée comme «assez élevée ».

4.2.3.2. Probabilité pour qu'un porc sain devienne infecté par la pique de la tique infectée

Les études menées expérimentalement par **Kleiboeker** en **1998** ont montré qu'un porc sain sur lequel des tiques infectées ont été nourries est devenu séropositif 2 à 4 jours plus tard, sa mort est survenue 6 à 8 jours après le nourrissage. D'après ces résultats, la probabilité pour qu'un porc soit infecté après la pique d'une tique molle est élevée.

En conséquence, la probabilité pour qu'un porc devienne infecté par la morsure de la tique, si la tique est présente, a été caractérisée comme « élevée », qui correspond à 8 sur l'échelle ordinale (Tableau 5).

Le tableau suivant (Tableau 12) résume les probabilités de ces différents événements qui constituent la probabilité de l'exposition.

Tableau 12 : Résumé de l'appréciation des probabilités des évènements constituant la probabilité de l'exposition du porc domestique

| Evènements successifs | Un porc soit en contact avec la tique infectée | Un porc devienne infecté |
|-----------------------|--|--------------------------|
| Probabilité | « Assez élevée » (AE) | « élevée » (E) |
| Echelle ordinale | 7 | 8 |

La probabilité d'exposition du porc domestique aux tiques molles infectées a été caractérisée en croisant ces deux probabilités. Elle a été calculée comme suit :

$$P = (AE) * (E) = (AE)$$

Elle a donc été caractérisée par une probabilité «Assez élevée », correspondant à 7 sur l'échelle ordinale du tableau 5.

4.2.4. Probabilité de survenue du danger par les tiques molles

La probabilité de survenue du danger a été caractérisée en croisant la probabilité de l'émission du virus par la probabilité de l'exposition du porc domestique aux tiques molles infectées. Le croisement a été réalisé à partir du tableau précédent (Tableau 6). Le résultat nous a donné une probabilité de survenue (PS) du danger égale à

$$PS = (TF) * (AE) = (EF)$$

La probabilité de survenue du danger par les tiques molles a donc été caractérisée comme « extrêmement faible ».

4.2.5. Conséquences de l'introduction du virus par les tiques molles

Les conséquences de l'introduction du virus de la PPA à Madagascar sont les mêmes quelles que soient les zones étudiées.

4.2.5.1. Les conséquences sanitaires et économiques pour un élevage

L'introduction du virus dans un cheptel porcin engendre une mortalité élevée pouvant aller jusqu'à 100%, entraînant une baisse de la production porcine dans l'élevage et une perte économique grave pour l'éleveur (**Rousset et al, 2001**). Les conséquences ont été qualifiées comme « élevées », correspondant à une valeur égale à 3 (Tableau 7).

4.2.5.2. Les conséquences en terme de diffusibilité de la PPA

Une fois introduit chez un porc, l'expérience montre que le virus s'est propagé très vite aussi bien dans l'élevage infecté que dans d'autres, dans une zone et ensuite dans d'autres zones de Madagascar. Le pays est d'ailleurs actuellement considéré comme une zone d'enzootie par rapport à cette maladie (**Costard, communication personnelle**). Par conséquent, les conséquences de la diffusibilité de la maladie ont été qualifiées comme « élevées », avec une valeur égale à 3 (Tableau 7).

4.2.5.3. Répercussions économiques nationales et/ou internationales

Durant la période pendant laquelle cette étude a été conduite (en 2006-2008), la situation d'embargo sur les productions porcines provenant du pays était déjà en vigueur, et aucun élément de notre étude n'a changé ni aggravé cette situation ; les conséquences économiques nationales sont donc considérées comme « faibles » correspondant à une valeur égale à 1 (Tableau 7).

La somme de ces trois conséquences donne l'appréciation des conséquences en santé animale (Tableau 13). Elle est évaluée à 7 et considérée comme « assez élevée » ou (AE) selon l'échelle ordinaire du tableau 5.

Tableau 13 : Appréciation des conséquences sur la santé animale

| Maladies | Conséquences sanitaires et économiques pour un élevage | Diffusibilité de la maladie | Répercussions économiques nationales et/ ou internationales | Conséquences cumulées pour la santé animale |
|---|--|-----------------------------------|---|--|
| Introduction de la peste porcine africaine | 3 | 3 | 1 | 7 |

4.2.6. Estimation du risque d'introduction du virus de la PPA par les tiques molles

L'estimation du risque d'introduction du virus de la PPA à travers les tiques molles a été obtenue en croisant la probabilité de survenue du danger par les conséquences, selon le tableau 9. L'estimation du risque d'introduction du virus par les tiques molles a été formulée comme suit : $P = (EF) * (AE) = (F)$

Elle a été donc appréciée comme « faible ».

En résumé, à Madagascar le risque d'introduction du virus de la PPA chez les porcs domestiques via les tiques molles a été apprécié comme « faible ».

4.3. Appréciation du risque d'introduction du virus de la PPA chez les porcs domestiques par les potamochères

4.3.1. Construction des modèles événementiels d'introduction du virus de la PPA par les potamochères

4.3.1.1. Modèle événementiel de l'émission

Les hypothèses suivantes ont été prises en compte pour établir ce modèle.

Il fallait que le potamochère soit présent dans le lieu d'étude, et qu'il soit infecté par le virus de la PPA (avec une prévalence d'infection connue), et qu'il soit infectieux (une quantité de virus/ml suffisante), (Figure 41).

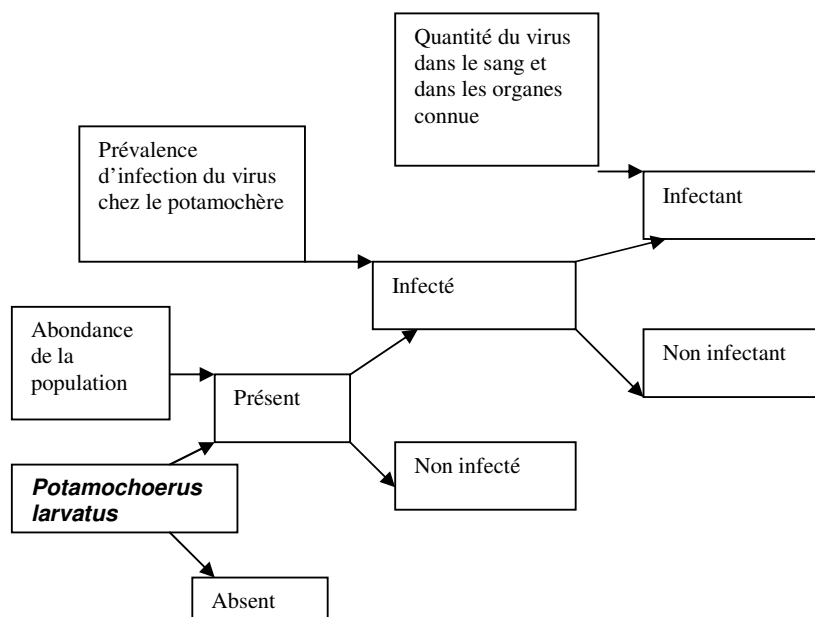


Figure 41 : Modèle événementiel de l'émission du virus par *Potamochoerus larvatus*

4.3.1.2. Modèle événementiel de l'exposition

Le porc domestique sain étant toujours le sujet exposé, nous avons considéré qu'il fallait (Figure 42) : qu'il soit en divagation totale, qu'il fréquente la forêt, qu'il soit en contact avec le potamochère infecté et qu'il se soit finalement infecté.

Trois scénarii ont été considérés également à propos du contact entre le porc et le potamochère infecté : le potamochère est libre, le potamochère est capturé vivant, le potamochère est abattu et sous forme de carcasse ou déchets.

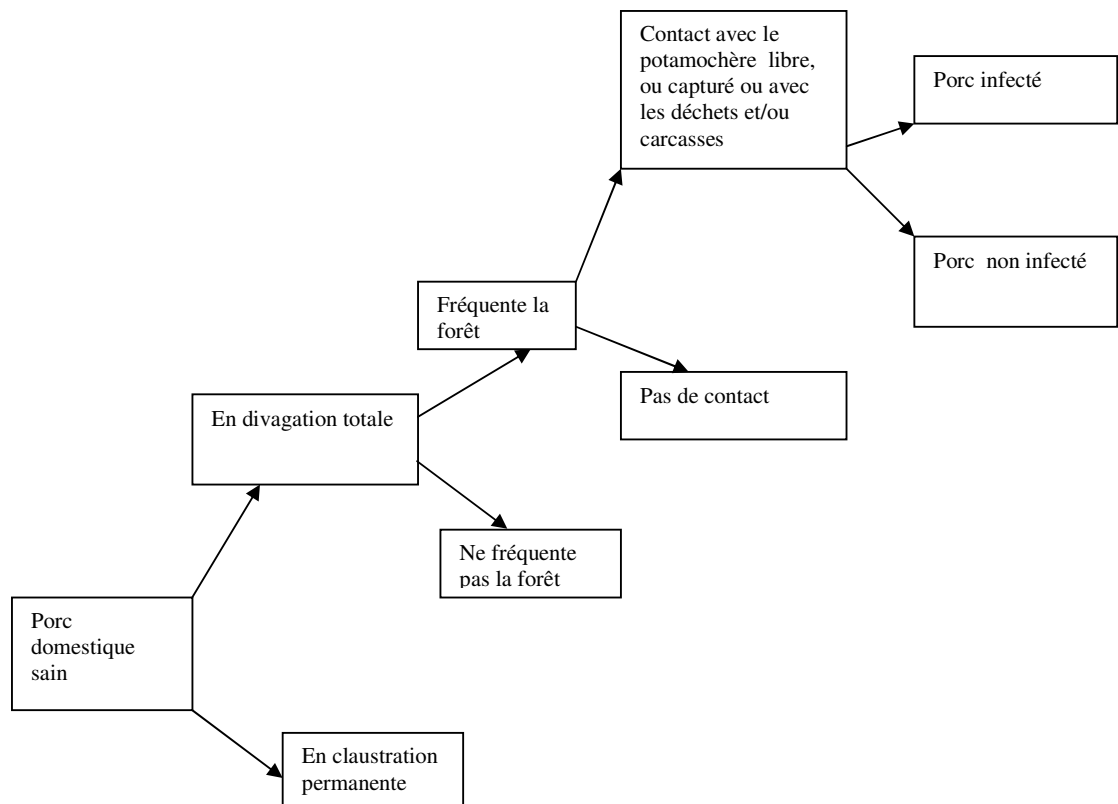


Figure 42 : Modèle événementiel de l'exposition du porc domestique sain au potamochère infecté

4.3.2. *Appréciation de la probabilité de l'émission du virus par les potamochères*

Les hypothèses suivantes ont été considérées pour pouvoir caractériser la probabilité de l'émission du virus par les potamochères : le potamochère est présent dans les zones d'étude, il est infecté par le virus de la PPA, il est infectant ou infectieux.

4.3.2.1. Probabilité de présence de potamochères dans les zones étudiées

a) **La zone de Marovoay**

La population de potamochères est abondante dans cette zone (**Andrianjakarivelo, 1999**). Les densités de populations de potamochères semblent importantes dans les zones forestières qui constituent leur habitat idéal, et en particulier dans les aires protégées tel que le Parc National d'Ankarafantsika, où ils restent à l'abri de leur seul prédateur, l'homme (**Goutard, 1999**). Ils peuvent être rencontrés également dans la forêt sèche semi-décidue dans cette zone. De ce fait la probabilité de trouver un potamochère dans cette zone a été caractérisée comme « élevée » ou (E), correspondant à la valeur 8 sur l'échelle ordinale du tableau 5.

b) **La zone d'Ambatondrazaka**

La probabilité de la présence de potamochères dans cette zone a été qualifiée comme « élevée » : cette zone contient en effet une importante étendue de forêt dense et humide particulièrement dans la région de Didy où les potamochères du genre *Potamochoerus larvatus hova* (**Grubb, 1993**) se concentrent en grande partie (**Andrianjakarivelo, 1999**). Les potamochères sont également présents dans les zones périurbaines d'Ambatondrazaka avec une prédominance des cultures (**Ravaomanana, communication personnelle**).

c) **Les zones d'Antananarivo-Arivonimamo et d'Antananarivo-Mahitsy**

Les potamochères sont absents dans ces zones des Hauts-plateaux à cause de la forte densité de la population humaine (**Andrianjakarivelo, 1999**). La probabilité de la présence de potamochère dans cette zone a donc été qualifiée comme « quasi-nulle ».

Comme nous n'avons pas assez de données sur les potamochères pour la zone d'Ambatondrazaka, les analyses qui suivent concernent surtout la zone de Marovoay.

4.3.2.2. Probabilité d'infection du potamochère

La détection du virus de la PPA par amplification du gène VP72 du virus a révélé des résultats négatifs pour tous les échantillons de potamochères malgaches analysés. La prévalence de la PPA chez les potamochères malgaches, avec un intervalle de confiance de 95% et un risque d'erreur de 5%, a par conséquent été considérée comme inférieure à 8% (**Ravaomanana et al, 2011**). En effet, notre échantillon était en nombre restreint et établi pour la détection d'une prévalence limite de 8%.

Certains auteurs estiment que le taux de prévalence de la PPA chez les potamochères est dix fois plus faible que chez les phacochères (**Mansvelt 1963**). Néanmoins, il a été suggéré que le virus de la PPA circule seulement de façon occasionnelle ou à une fréquence très faible ou ne circule pas du tout chez les potamochères malgaches (**Jori et al, 2007**). De ce fait, la probabilité pour qu'un potamochère soit infecté a été caractérisée comme « très faible ».

4.3.2.3. Probabilité pour que le potamochère soit infectant

L'infection du potamochère par le virus de la PPA provoque une réplication virale faible et des dommages pathologiques peu importants : une faible dissémination du virus est notée dans le tissu lymphoïde (**Oura et al, 1998**). Il a été aussi prouvé que le virus persiste dans les tissus lymphatiques pendant au moins 34 semaines avec une quantité plus faible de particules virales allant de 10^2 à $10^{4,9}$ HAD50/ml après l'infection (**Anderson et al, 1998**).

Selon ces études, la probabilité pour que le potamochère soit infectant a été qualifiée comme « très faible » ou (TF).

Le tableau suivant (Tableau 14), récapitule les probabilités des événements constituant l'appréciation de l'émission.

Tableau 14 : Récapitulatif des probabilités des évènements de l'émission

| | Le potamochère soit présent | Le potamochère soit infecté | Le potamochère soit infectant |
|--|--|--|--|
| Probabilité | « élevée » (E) | « très faible » (TF) | « très faible » (TF) |
| Echelle ordinale selon le tableau 5 | 8 | 4 | 4 |

La probabilité de l'émission du virus de la PPA par les potamochères a été obtenue en croisant toutes les probabilités des évènements du tableau ci-dessus (Tableau 14). Elle est formulée comme suit : $P1=(E)*(TF)*(TF)= (M)$

La probabilité de l'émission du virus par les potamochères est donc considérée comme « minime ».

4.3.3. Probabilité de l'exposition du porc sain au potamochère infecté

La probabilité de l'exposition du porc a été obtenue en croisant toutes les probabilités des évènements qui constituent le modèle événementiel de l'exposition (Figure 42).

4.3.3.1. Probabilité pour qu'un porc soit en divagation totale

Dans la région de Marovoay, l'effectif total des éleveurs de porcs recensés en 2005-2006 est autour de 240 ; 90,8% des élevages sont en claustration permanente, 0,4% seulement sont en divagation totale et les 8,8% restant sont en semi-divagation (**MPE, 2006**). Par ailleurs, selon l'étude menée par Humbert en 2006 (**Humbert, 2006**) après l'introduction de la PPA dans le pays, les porcs qui sont en majorité de race métisse (68,2%) sont maintenus en claustration quasi permanente (91,2%), à l'exception de quelques porcs de race locale qui sont en divagation pendant la journée. Ainsi la probabilité qu'un porc soit en divagation totale dans cette zone est qualifiée comme « très faible ».

4.3.3.2. Probabilité pour qu'un porc fréquente la forêt

Selon les enquêtes menées lors de cette présente étude (cf. Fiche d'enquête sur les tiques molles en annexe), la presque totalité des élevages se situent loin de la forêt. La probabilité pour qu'un porc fréquente la forêt a été caractérisée comme « très faible ».

4.3.3.3. Probabilité de contact entre le potamochère infecté et le porc sain

a) Premier scénario : le potamochère infecté est libre naturellement

La présence suspectée d'hybrides (croisements entre porc domestique et potamochère) pourrait confirmer l'existence d'un contact entre ces deux espèces. Ces cas ont été signalés dans plusieurs pays d'Afrique de l'Ouest, Australe et Centrale (le Burkina Faso, le Gabon ou le Zaïre) (Simoons, 1953 ; Vercammen et al, 1993). Le même phénomène est aussi décrit à Madagascar dans des zones d'élevage de porcs en divagation comme Katsepy, Mahajamba, Soalala (Goutard, 1999). Selon les enquêtes menées par la MPE (MPE, 2006), le pourcentage d'animaux hybrides dans cette zone de Marovoay est 1,3% environ.

La probabilité de contact entre un potamochère infecté libre et un porc domestique en divagation pourrait donc être qualifiée comme « extrêmement faible » dans les zones urbaines mais elle est considérée comme « peu élevée » dans les zones plus éloignées des centres urbains (Ankazomborona, Manaratsandry, Tsararano, Ankarabato etc....).

b) Deuxième scénario : le potamochère infecté est capturé vivant

Selon nos enquêtes, les animaux sont piégés dans 72% des cas par des chasseurs qui pratiquent la capture grâce à des pièges trappes de fabrication artisanale permettant la capture d'animaux vivants, en vue de résoudre les problèmes de conservation de la viande. Ils sont ensuite transportés en général à pied (80%) jusqu'au lieu de garde, bien clôturé, en attendant leur abattage.

Dans la zone de Marovoay, 60% des chasseurs parquent les potamochères capturés dans le lieu de garde pendant seulement un jour. Le contact pourrait ainsi se faire par accident si les porcs arrivaient à pénétrer dans le lieu de garde des potamochères car, dans la zone de Marovoay, 8,3% des chasseurs sont aussi des éleveurs de porcs.

En considérant tous ces éléments, la probabilité de contact entre un potamochère infecté capturé vivant et un porc domestique a été caractérisée comme « extrêmement faible ».

c) Troisième scénario : le potamochère infecté est abattu et présenté sous forme de carcasse ou déchets

Le sang du potamochère infecté mais aussi les organes comme la rate ou les ganglions lymphatiques sont les morceaux les plus infectants (Oura, 1998). Les organes de potamochère sont considérés comme des déchets dans cette étude.

D'après nos enquêtes, dans la zone de Marovoay, 50% des chasseurs laissent les carcasses et les déchets de leur gibier dans le lieu d'abattage sans les détruire. Deux hypothèses peuvent être considérées pour analyser ce problème :

- Si le potamochère infecté a été abattu dans un endroit où les porcs en divagation peuvent accéder, la probabilité de contact du porc avec les déchets ou carcasse du potamochère infecté a été caractérisée comme « assez élevée » ou (AE).
- Si le potamochère a été abattu dans un endroit où aucun porc ne peut accéder, la probabilité de contact du porc avec les déchets ou carcasse a été caractérisée comme « quasi- nulle » ou (QN).

Le tableau suivant (Tableau 15) présente le résumé des probabilités des différents événements qui constituent la probabilité de l'exposition des potamochères au virus de la PPA.

Tableau 15 : Récapitulatif des probabilités des évènements constituant le modèle événementiel de l'exposition du porc

| | | | Le potamochère est en contact avec le porc | | |
|------------------|----------------------------------|----------------------------|--|-----------------------------------|--|
| | Le porc est en divagation totale | Le porc fréquente la forêt | Le potamochère est libre | Le potamochère est capturé vivant | Le potamochère est abattu et sous forme de carcasse ou déchets |
| Probabilité | « très faible » (TF) | « très faible » (TF) | «extrêmement faible » à « peu élevée » (EF) à (PE) | « extrêmement faible » (EF) | « quasi-nulle » à « assez élevée » (QN) à (AE) |
| Echelle ordinale | 4 | 4 | 3 à 6 | 3 | 1 à 7 |

La probabilité de l'exposition du porc a été obtenue en croisant les probabilités de tous ces évènements du tableau ci-dessus (Tableau 15).

- Si le potamochère est libre : la probabilité de l'exposition du porc a été caractérisée comme $P1 = (TF) * (TF) * (EF)$ ou $P2 = (TF) * (TF) * (PE)$ c'est-à-dire « quasi-nulle » ou « minime ».
- Si le potamochère est capturé vivant : la probabilité de l'exposition du porc a été qualifiée comme $P3 = (TF) * (TF) * (EF) = (QN)$ ou « quasi-nulle ».
- Si le potamochère est abattu sous forme de carcasse ou déchets, la probabilité de l'exposition du porc a été qualifiée comme $P4 = (TF) * (TF) * (QN) = (QN)$ ou $P5 = (TF) * (TF) * (AE) = (M)$, c'est-à-dire « quasi-nulle » ou « minime ».

4.3.4. Probabilité de survenue du danger

La probabilité de survenue du danger via les potamochères a été obtenue en croisant la probabilité de l'émission du virus avec la probabilité de l'exposition du porc aux potamochères infectés. Les trois scénarii (potamochère infecté libre ou capturé vivant ou abattu et sous forme de carcasse ou déchets) ont été considérés.

- Si le potamochère infecté est libre, cette probabilité a été qualifiée comme la probabilité $PS1 = (M) * (QN) = (QN)$ ou la probabilité $PS2 = (M) * (M) = (QN)$, c'est-à-dire la probabilité de survenue du danger a été qualifiée uniquement comme « quasi-nulle ».
- Si le potamochère infecté est capturé vivant, la probabilité de survenue du danger a été appréciée comme $PS3 = (M) * (QN) = (QN)$ ou « quasi-nulle ».
- Si le potamochère infecté est abattu et sous forme de carcasse ou déchets, la probabilité de survenue du danger a été caractérisée comme les probabilités $PS4 = (M) * (QN) = (QN)$ ou $PS5 = (M) * (M) = (QN)$; c'est à dire la probabilité de survenue du danger a été qualifiée uniquement comme « quasi-nulle ».

En résumé, dans la zone de Marovoay la probabilité de survenue du danger à travers les potamochères a été appréciée comme « quasi-nulle ».

4.3.5. Appréciation des conséquences

Les conséquences de l'introduction du virus de la PPA par les potamochères à Madagascar sont les mêmes que celles trouvées précédemment à travers les tiques molles. Elles sont les mêmes dans toutes les zones touchées par la PPA.

4.3.5.1. Les conséquences sanitaires et économiques pour un élevage

Elles ont été qualifiées comme « élevées », correspondant à une valeur égale à 3 du Tableau 7.

4.3.5.2. Les conséquences en terme de diffusibilité de la PPA

Elles ont été également qualifiées comme « élevées », avec une valeur égale à 3 (Tableau 7).

4.3.5.3. Répercussions économiques nationales

Les conséquences engendrées ont été caractérisées comme « faibles », correspondant à une valeur égale à 1 selon le tableau 7.

La somme de ces trois conséquences a donné l'appréciation des conséquences en santé animale (Tableau 16). Elle est donc considérée comme « assez élevée » (AE), avec une échelle ordinale égale à 7 selon le tableau 5. Le tableau suivant (Tableau 16) indique les conséquences ainsi que les valeurs qu'on leur a accordées.

Tableau 16 : Probabilités de conséquence de l'introduction du virus de la PPA via les potamochères

| Maladies | Conséquences sanitaires et économiques pour UN élevage | Diffusibilité de la maladie | Répercussions économiques nationales et/ ou internationales | Conséquences cumulées pour la santé animale |
|--------------------------------|--|-----------------------------|---|---|
| Peste porcine africaine | 3 | 3 | 1 | 7 |

4.3.6. Le risque d'introduction du virus par les potamochères

Le risque d'introduction du virus de la PPA chez les porcs domestiques malgaches par les potamochères dans la zone de Marovoay a été finalement obtenue en croisant la probabilité de survenue du danger avec les conséquences, selon le tableau 9. Il a été formulé comme suit :

$R = (QN) \cdot (AE) = F$ ou « Faible »

Le risque d'introduction du virus de la PPA au porc domestique par les potamochères a été qualifié comme « faible ».

5. Discussion

Nous avons considéré dans cette étude que les hôtes sauvages malgaches sont capables de s'infecter, de multiplier le virus de la PPA et de transmettre la maladie aux porcs domestiques. Le deuxième cas qui pourrait être également considéré est que les porcs domestiques infectés peuvent transmettre le virus aux hôtes sauvages. En vue d'estimer le risque d'endémisation du pays vis-à-vis de cette maladie, il serait également intéressant d'analyser le risque représenté

par ce deuxième cas. Mais, en raison du manque de données disponibles, l'analyse n'a finalement été réalisée que pour répondre au premier cas.

Dans ce deuxième cas, les hypothèses suivantes devraient être prises en compte : le porc domestique est présent, infecté, infectant, et en contact avec les tiques molles ou les potamochères qui deviennent infectés.

Selon les résultats de l'étude d'épidémio-surveillance menée en 2006 par Costard dans les zones de Marovoay, d'Ambatondrazaka et d'Antananarivo-Arivonimamo (**Costard, données non publiées**), à l'exception de la première période (1998) suivant l'introduction de la maladie à Madagascar, de faibles taux de mortalité étaient habituellement déclarés par les éleveurs de porc. En outre 0,3% des porcs étaient séropositifs et 3% des animaux étaient infectés par le virus de la PPA : la probabilité d'infection des porcs serait alors considérée comme « faible ». Cependant comme des foyers de PPA émergent régulièrement chaque année dans ces zones d'étude selon les études de Costard (**Costard, données non publiées**), le risque d'introduction du virus du porc domestique vers le cycle sauvage pourrait être qualifié comme « peu élevé » dans les zones où ces hôtes sauvages (tique molle et/ou potamochère) sont présents.

De plus, la maladie a été détectée initialement (en 1998) à partir du virus isolé chez les porcs domestiques (**Gonzague et al, 2001**) et les tiques molles collectées à Mahitsy en 2000 et en 2007-2008 sont infectées (**Ravaomanana et al, 2010**). Ces observations pourraient suggérer le passage du virus du porc domestique aux tiques molles. Dans cette hypothèse, la probabilité d'introduction du virus du porc domestique vers les tiques molles dans la zone d'Antananarivo-Mahitsy pourrait être qualifiée comme « élevée ». Par conséquent le risque d'endémisation de la maladie serait considéré comme « élevé ».

Comme dans notre étude, les tiques molles n'ont été trouvées que dans une seule porcherie à Mahitsy et la prévalence de la PPA chez les potamochères a été considérée entre « extrêmement faible » et « quasi-nulle », on pourrait estimer que le risque d'introduction du virus du porc domestique vers le cycle sauvage n'est pas très différent de celui de l'introduction du virus du cycle sauvage vers le porc domestique. Dans tous les cas, des études plus poussées devraient être envisagées à l'avenir pour clarifier cette situation.

Outil d'aide à la décision, l'analyse de risque est une méthode permettant l'utilisation rationnelle des connaissances et des données disponibles à un moment donné afin d'optimiser la prise de décision. Généralement, la précision et la qualité des résultats obtenus par cette méthode sont directement liées à la qualité et à la précision des données disponibles (**AFSSA, 2008**).

La méthode d'analyse choisie pour la présente étude est une méthode qualitative relativement simple et récente, préconisée par l'OIE en 2007 (**OIE, 2007**). Cette méthode qualitative a été utilisée également dans d'autres pays, par exemple pour estimer le risque d'introduction du virus de l'influenza aviaire hautement pathogène au Sénégal (**Mayigane, 2008**) ou en Ethiopie (**Olive, 2007**), pour estimer le risque d'introduction du virus de la fièvre aphteuse en Europe et en Russie (**Moutou, 2001**), pour estimer le risque d'épizootie de peste bovine en République Centrafricaine à partir du Tchad et du Soudan (**Hendrikx, 2001**). La méthode qualitative présente l'avantage de pouvoir être utilisée alors que de nombreuses données chiffrées sont manquantes. Toutefois, la précision de cette méthode sera d'autant plus faible que le nombre de données manquantes est grand (**AFSSA, 2008**).

Elle a permis d'avoir une première vue sur le risque d'introduction du virus de la PPA par le cycle sauvage existant à Madagascar. Néanmoins, dans cette étude, plusieurs facteurs de risque n'ont pas été considérés tels que les vecteurs inanimés ou fomites, les vecteurs biologiques comme les poules et les chiens qui peuvent emmener des restes de carcasses ou déchets de potamochère infecté dans les porcheries, ou le chasseur qui est à la fois éleveur de porc et qui s'est occupé de ses porcs directement après avoir manipulé des carcasses ou des déchets de potamochère infectés, les vecteurs mécaniques comme les matériels souillés utilisés lors de l'abattage de potamochère, etc....Par manque de données, ces facteurs n'ont pas été considérés. Pourtant, ces facteurs pourraient augmenter sensiblement le risque d'introduction du virus aux porcs domestiques par les potamochères, risque qui a été appréciée dans cette étude comme « faible ».

Cependant, la présence de potamochères ainsi que la forte consommation de leur viande dans plusieurs zones de Madagascar (**Jori, 2007**) à l'exception des régions des Hauts-plateaux (**Andrianjakarivelo, 1999**), représentent toujours un risque potentiel pour les élevages de porcs à Madagascar, quoique ce risque ait été qualifié pour le moment comme « faible ».

Le fait de n'avoir pas trouvé des tiques molles dans les zones de Marovoay, d'Ambatondrazaka et d'Antananarivo-Arivonimamo ne traduit pas une absence définitive de ces tiques dans ces trois zones car les résultats du test ELISA anti-tique pour la détection du contact porc-tique laisse supposer l'existence de ce contact. Elles sont peut-être présentes mais à une très faible densité : nous avons d'ailleurs suggéré dans le chapitre II (cf. discussions sur les tiques dans la deuxième partie) que plusieurs facteurs pourraient intervenir pour expliquer ce résultat négatif de recherche de tiques molles. Nous ne pouvons, dans tous les cas, pas qualifier le risque comme « nul » sachant que ces tiques ont été mentionnées

depuis le début de XX^{ème} siècle, surtout dans la zone de Marovoay (**Lamoureux, 1913 ; Néel 1949**).

La présence de ces tiques molles à Madagascar est un danger pour les éleveurs de porcs, surtout dans la zone d'Antananarivo-Mahitsy et du pays tout entier : cette présence rend effet difficile les propositions de mesures de contrôle et de lutte contre la PPA ainsi que l'éradication de cette maladie.

6. Conclusion

La présence des deux hôtes sauvages (réservoir et /ou vecteur) du virus de la PPA (les tiques molles, *O. porcinus spp* et les potamochères, *Potamochoerus larvatus*) à Madagascar nous a conduit à faire cette analyse afin d'estimer les risques que ces hôtes pouvaient représenter dans la transmission du virus aux porcs domestiques. Cette analyse est la première de ce type effectuée à Madagascar. La méthode qualitative décrite par l'OIE en 2007 (**OIE, 2007**) a été utilisée. Les risques inhérents à chacun des hôtes (tique molle et potamochère) ont été analysés séparément car les modalités d'introduction du virus à travers chacun d'entre eux étaient spécifiques.

L'estimation du risque d'introduction du virus par ces deux hôtes a été caractérisée à partir des différentes étapes basées sur les modèles événementiels et en considérant plusieurs hypothèses intervenues dans cette étude. Pour les tiques molles et les potamochères, le risque d'introduction du virus de la PPA au porc domestique à Madagascar a été apprécié comme « faible ».

Concernant les potamochères, le degré d'incertitude sur le risque qu'ils représentent est grand car les données sont encore insuffisantes par rapport à un point clé de l'arbre événementiel qui est la circulation de virus au sein de leurs populations. Ce constat limite fortement la valeur des appréciations estimées. Si de nouvelles informations deviennent disponibles, le risque devrait être ré-évalué.

Dans toutes les façons, des mesures préventives draconiennes devraient être appliquées par les éleveurs pour limiter le risque d'introduction du virus via ces hôtes sauvages dans leur cheptel. Le nettoyage des porcheries avec des acaricides et des insecticides, le déparasitage externe des porcs d'une façon régulière, l'amélioration de la conduite d'élevage en claustration permanente, la limitation du contact porc- potamochère par la consommation de la viande de ce dernier etc.... sont des actions simples à entreprendre mais importantes pour diminuer ce risque.

Des études plus poussées devraient être effectuées à l'avenir en vue d'estimer le risque d'endémisation de la maladie par la transmission du virus aux hôtes sauvages par le porc.

DISCUSSION GENERALE

La présence de contacts entre le porc domestique et la tique molle a été mise en évidence dans les trois zones d'étude (Marovoay, Ambatondrazaka et Antananarivo-Arivonimamo) grâce au test Elisa anti-tique pratiqué sur des sérums de porc. Ce test a été d'ailleurs mis au point en Espagne pour détecter ce type de contact (**Canals et al, 1990**). D'après nos résultats, seule la zone de Marovoay a montré un contact certain entre les porcs et les tiques molles pour 1,1% des porcs ; 39,1 % des 271 individus analysés, répartis dans les trois zones, avaient des résultats douteux (**Ravaomanana et al, 2010**).

Si dans la zone de Marovoay, les tiques molles existent effectivement, la probabilité de leur présence est toutefois considérée comme faible. Ainsi aucune tique n'a été trouvée lors de la collecte dans les porcheries. Différentes raisons comme les mouvements des porcs (commerce et échange) ainsi que le délai entre le prélèvement de sérum et la recherche de tiques sur le terrain (deux ans environ) ont été déjà évoquées pour expliquer l'absence des tiques molles dans les porcheries alors que le test ELISA anti-tique était positif. En outre, il a été également suggéré dans cette étude que la disparition progressive de la tique molle dans la zone pourrait être due à diverses raisons : changement climatique, utilisation de pesticides dans les habitations humaines pour lutter contre le paludisme (**Rodhain en 1989**), ou utilisation excessive de désinfectants après l'introduction de la PPA dans le pays (**Costard et al, 2009**).

Dans les zones d'Ambatondrazaka et d'Antananarivo-Arivonimamo où les résultats du test ELISA anti-tique des sérums sont douteux ou négatifs, il est toutefois impossible d'affirmer l'absence totale de tiques molles dans ces deux zones quoique la recherche de tiques dans les porcheries s'avère négative et malgré l'absence d'étude rapportant la présence de tiques molles dans la zone d'Ambatondrazaka. Des études complémentaires pourraient à l'avenir éclaircir cette situation. En effet, nous pouvons cependant suggérer que la probabilité de présence de tiques dans ces deux zones est considérée comme extrêmement faible.

Notre étude a pu également confirmer la présence de tiques *Ornithodoros porcinus spp* à Madagascar malgré leur concentration dans une seule porcherie de la zone d'Antananarivo-Mahitsy (**Ravaomanana et al, 2010**).

Aucun sérum de porc n'a été testé pour vérifier ce contact « porc-tique molle » dans cette zone, il n'y avait d'ailleurs plus de porc dans le local infesté. La présence de tiques infectées par le virus de la PPA dans cette porcherie (**Ravaomanana et al, 2010**) nous indique que ce contact a fort probablement eu lieu, l'infection des tiques par le virus étant certainement due au contact avec des porcs infectés. Ces observations font penser que le risque de transmission du virus du porc domestique à la tique molle est estimé comme élevé dans cette zone. En conséquence, le risque d'endémisation de la maladie dans le pays pourrait également être considéré comme élevé.

La persistance de tiques infestées est également probable dans la porcherie infestée de Mahitsy malgré les désinfections successives appliquées. Les porcs sains qui seraient logés dans cette porcherie seront exposés à l'infection virale. Dans ce cas, le risque de transmission du virus de la PPA aux porcs domestiques via les tiques molles est considéré comme élevé dans cette zone. En conséquence, des mesures destinées à prévenir l'introduction de tiques molles dans le cheptel doivent être prises par les éleveurs pour réduire ces risques.

Par ailleurs, la détection de l'infection par le virus de la PPA dans les tiques molles collectées en 2000 et en 2007-2008 dans ce même bâtiment de Mahitsy, sans introduction de porcs potentiellement infectés pendant plusieurs années avant la seconde détection, suggère une capacité de persistance à long terme du virus chez les espèces d'*O. porcinus spp* malgaches. Une telle persistance du virus pendant cinq à dix ans dans les mêmes individus, ou parmi une population de tiques à travers des transmissions transovariennes et sexuelles, n'avait jamais été rapportées pour les tiques vectrices africaines (**Plowright 1970, 1974, Rennie 2001**).

Nous avons ainsi montré pour la première fois dans cette étude que l'espèce d'*O. porcinus* de Madagascar peut être un vecteur compétent et un réservoir naturel pour le virus de la PPA.

Le contact « porc-tique molle » est un phénomène courant dans la plupart des pays touchés ou non par PPA. Les tiques molles *O. erraticus* ont ainsi colonisé les porcheries d'Espagne et du Portugal (**Caiado, 1988 ; Oleaga-Perez, 1990**). Cette association porc-tique molle est fréquente : elle a été confirmée en Angola par Wellman depuis 1906, au Malawi par Haresnape en 1989 et récemment par Quembo en Mozambique (**Quembo, communication personnelle**). A Madagascar, cette association porc-tique molle avait déjà été signalée en

1963 bien avant l'introduction de la PPA par Uilenberg qui avait trouvé *O. porcinus* dans des porcheries de Mahasolo (**Uilenberg, 1963**). Une telle association a été confirmée par la présente étude (**Ravaomanana et al, 2010**).

En revanche, nos résultats du test ELISA anti-tique sur les sérums de potamochère et de la détection de l'infection par le virus chez le potamochère, sont tous négatifs, il paraît ainsi qu'il n'y a pas de contact entre la tique molle et le potamochère malgache (**Jori et al, 2007 ; Ravaomanana et al, 2011**). Cette absence de contact pourrait être due au fait que les tiques molles semblent plus ou moins domestiquées et adaptées aux habitations humaines (**Lamoureux, 1913**) et aux porcheries (**Uilenberg, 1963 ; Roger et al, 2001 ; Ravaomanana et al, 2010**).

En Afrique également, où il a été démontré que les potamochères sont des réservoirs efficaces pour le virus de la PPA (**Anderson, 1998 ; Luther, 2007 ; Oura, 1998**), il semble improbable que ces animaux aient une relation étroite avec les tiques molles *Ornithodoros* puisqu'ils ne fréquentent pas en général les terriers qui peuvent être infestés par les tiques. Néanmoins, dans quelques régions d'Afrique où il existe un chevauchement entre l'habitat du potamochère et celui du couple phacochère–tique, le contact entre la tique molle et le potamochère pourrait se produire (**Anderson et al, 1998 ; Roger et al, 2001**).

En Afrique australe et orientale, la PPA est généralement maintenue par la présence du cycle d'infection entre les phacochères et les tiques molles, rendant l'éradication de la maladie plus difficile. Les tiques molles *O. moubata*, *O. porcinus porcinus* et *O. porcinus domesticus* jouent le rôle du vecteur et de réservoir du virus (**Plowright et al, 1969**). La transmission directe du virus du phacochère au porc domestique n'a jamais pu être démontré malgré un contact étroit ; elle intervient probablement en règle générale via les tiques molles (**Kleiboeker & Scoles, 2001 ; Penrith et al, 2004**).

En Afrique australe et orientale, la transmission horizontale ou verticale du virus entre les phacochères ne peut pas se produire et l'introduction du virus dans leur population dépend du contact avec la tique molle *O. moubata* qui habite dans les terriers (**Thomson 1980 ; Plowright 1981**). En Afrique de l'ouest, l'existence d'un tel cycle n'a jamais été démontrée, sauf avec *O. porcinus porcinus* dans un terrier de phacochère en Sierra Leone (**Penrith et al, 2004**). En Europe, le contact entre les sangliers et les tiques molles *O. erraticus* infectées n'a jamais été démontré (**Laddomada et al, 1994**) ; les sangliers ne vivent pas dans des terriers ce qui est aussi le cas des potamochères.

D'après nos résultats sur l'infection virale, le potamochère malgache n'est pas encore infecté par la PPA. La transmission du virus du porc domestique vers le potamochère ne s'est pas encore faite, ce qui peut être dû à un contact porc-potamochère presque inexistant. Dans ce cas, à Madagascar, il n'y aurait pas de cycle sylvatique mais uniquement un cycle chez le porc domestique et les tiques molles dans les zones où elles sont présentes. Notre étude suggère ainsi que le potamochère joue un rôle négligeable dans l'épidémiologie de la PPA à Madagascar. Le risque d'introduction du virus au porc via le potamochère est considéré comme faible.

En revanche, le risque de transmission du virus aux potamochères à partir des porcs domestiques pourrait exister parce que des foyers de PPA, avec des cas confirmés (**Michaud, communication personnelle**), se manifestent régulièrement dans les zones de Marovoay et d'Ambatondrazaka où la présence de potamochères a été signalée (**Andrianjakarivelo, 2003 ; Jori, 2007**). Comme le contact entre les porcs infectés et la population de potamochère peut intervenir, le risque d'endémisation de la maladie dans le pays, à travers un cycle chez le potamochère, reste présent.

En Afrique, dans quelques régions du Malawi par exemple, des foyers de PPA chez les porcs domestiques sont déclarés en présence de potamochères et en absence de phacochères et de tiques molles (**Wilkinson 1984; Haresnape et al, 1985**). Ce contact « porc-potamochère » pourrait être possible dans certains pays d'Afrique au moment où les potamochères viennent pâturer dans les champs de culture avec les porcs en divagation (**Haresnape et al, 1985**) ; dans ce cas, si des porcs sont infectés et meurent dans les champs, il est probable que les potamochères peuvent devenir infectés en ingérant les carcasses de porc. Le cas inverse pourrait également avoir lieu : des porcs domestiques en divagation pourraient s'infecter par ingestion des organes et/ou de carcasses de potamochères infectés (**Penrith et al, 2004**). Dans tous les cas, selon différents auteurs, le rôle des potamochères dans l'épidémiologie de la PPA serait moins importants que celui des phacochères (**Thomson 1985 ; Wilkinson 1988 ; Plowright et al, 1994**).

La présente étude a permis également de déterminer le statut phylogénétique des espèces d'*O. porcinus* malgaches collectées à Mahitsy en 2000 et en 2007-2008. Collectées dans une porcherie qui faisait également office d'une habitation humaine, elles appartiennent à la sous-espèce *O.p.domesticus*, comme suggéré précédemment par Uilenberg en 1963. La tique causant la fièvre récurrente dans les populations du nord-ouest et de l'ouest de Madagascar en

1911 avait été identifiée simplement comme *O. moubata* par Chatton et Roubaud (**Lamoureux, 1913**). Cette tique, trouvée en 1962 dans une porcherie à Mahasolo, avait alors été rapprochée de la sous-espèce *O. p. domesticus* mais possédant également quelques caractères d'*O. p. porcinus* (**Uilenberg, 1963**).

Par ailleurs, il paraît certain qu'à l'origine la tique malgache a été introduite à partir de la côte orientale africaine selon leur nom « kongon'morimo », ce qui signifie « punaise de Makoas » (**Poisson, 1930 ; Suldey, 1916**). Les Makoas représentent une population originaire de la côte orientale de l'Afrique.

A Madagascar, ces tiques semblent stables phylogénétiquement car 90 années plus tard, la même espèce a été retrouvée dans deux lieux éloignés de plus de 150 km et aux conditions climatiques et écologiques différentes : à Mahasolo, il fait chaud et sec, alors localisé sur les Hauts-plateaux, Mahitsy présente un climat froid et humide. Les tiques ne vivent pas à l'extérieur, où le climat peut être rude, mais elles sont trouvées concentrées à l'intérieur de la porcherie (tique endophile) où règne constamment un microclimat approprié et stable, propice à leur développement (**Walton 1962, Vial 2009**).

La présente étude a pu montrer que ces tiques collectées en 2000 et 2007-2008 sont également très proches phylogénétiquement des tiques tanzaniennes qui transmettent *Borrelia duttonii*, agent étiologique de la fièvre récurrente humaine (**Fukugana 2001, Mitani 2004**).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le virus de la PPA circule à Madagascar depuis 1997. Plusieurs études ont montré que cette souche du virus a le même génotype (génotype II) que celles présentes au Mozambique, en Zambie, récemment en Géorgie et sur l'Ile Maurice (**Bastos et al, 2003, 2004; Penrith et al, 2007 ; Beltran-Alcrudo et al, 2008 ; Rowlands et al, 2008**). La maladie devient actuellement enzootique à Madagascar. Elle provoque presque chaque année des foyers dans plusieurs régions (**MPE, 2005**) avec des cas confirmés surtout dans les zones de Marovoay, d'Ambatondrazaka et d'Antananarivo-Arivotrimamo (**Michaud, communication personnelle**). En outre, les tiques molles et les potamochères qui sont des hôtes sauvages du virus de la PPA (**Sanchez-Botija, 1963 ; Thomson, 1985**) existent également à Madagascar (**Lamoureux, 1913 ; Andrianjakarivelo, 2003**).

La présente étude a été réalisée pendant trois ans en vue de déterminer si les hôtes sauvages de la PPA sont encore présents à Madagascar, et si un éventuel contact entre ces hôtes sauvages et le porc domestique aurait des conséquences en matière d'épidémiologie de la maladie. L'estimation du risque d'introduction du virus dans des élevages de porcs domestiques par ces hôtes sauvages est également un des objectifs de cette étude.

Les travaux ont été menés dans trois zones principales qui peuvent être qualifiées de zones d'interface. La zone d'Antananarivo-Mahitsy a été ajoutée à cette étude épidémiologique de la PPA en vue de confirmer la présence des tiques molles dans cette zone (**Roger et al, 2001**).

La zone de Marovoay est considérée comme une zone d'interface du fait de la présence simultanée de tiques molles *O. porcinus spp* depuis le début du XX^{ème} siècle (**Lamoureux, 1913 ; Suldey 1916 ; Poisson 1930 ; Néel, 1949**), de potamochères (**Andrianjakarivelo, 2003 ; Jori, 2007**) et de foyers réguliers de la PPA (**MPE, 2005 ; Michaud, communication personnelle**). Nous considérons qu'elle l'est toujours bien que la recherche de tiques molles dans les porcheries de cette zone ait été négative pour le moment (**Ravaomanana et al, 2010**). Néanmoins, pour diverses raisons (manque de temps, manque de moyens logistiques), il s'agit de la seule zone où simultanément l'étude sur le rôle des tiques molles et celui des potamochères dans l'épidémiologie de la PPA a été effectuée. Malgré l'insuffisance de données sur les potamochères dans la zone d'Ambatondrazaka par exemple, les résultats obtenus dans la zone de Marovoay peuvent être considérés comme des résultats préliminaires mais valables pour le pays et pourraient être utilisés dans des prochaines études.

Cette étude a confirmé la présence d'*O. porcinus spp* à Madagascar dans une porcherie à Mahitsy dans la zone d'Antananarivo. Il a été démontré également que ces tiques se rapprochent phylogénétiquement des tiques *O. moubata* tanzaniennes et sont également étroitement liées à *O. porcinus domesticus*. Il est probable que toutes les tiques malgaches appartiennent à la même sous-espèce *O. p. domesticus*, que ce soient les tiques collectées dans les habitations humaines dans les zones nord-ouest et ouest du pays durant le début du XX^{ème} siècle et causant la fièvre récurrente humaine, les tiques collectées dans les porcheries dans la zone de Mahasolo entre les années 60 et 80, ou les tiques collectées dans une porcherie à Mahitsy en 2000 et en 2007-2008.

Sur le plan épidémiologique, il a été démontré dans cette étude la forte probabilité de contact entre le porc domestique et la tique molle, du moins dans la zone de Marovoay et dans la zone d'Antananarivo-Mahitsy. Par contre, l'étude suggère l'absence de contact entre le

potamochère et la tique molle et entre le potamochère et le porc domestique vis –à-vis de la PPA.

Par ailleurs, cette étude nous a fourni aussi des informations sur la prévalence de la PPA à Madagascar chez les tiques molles : elle a une valeur comprise entre 6,8% et 9,5%. Chez les potamochères, cette prévalence est nulle ou du moins inférieure à 8% car aucun virus n'a été détecté dans les prélèvements analysés.

Cette étude suggère pour la première fois que les *O. porcinus* malgaches peuvent être un vecteur compétent et un réservoir naturel pour le virus de la PPA. Des études futures sur la compétence vectorielle devraient être menées au CIRAD pour confirmer ce rôle au moyen d'infections expérimentales.

La présence des tiques molles infectées *O. porcinus domesticus* à Madagascar est un danger potentiel pour les élevages de porcs du pays vu que la maladie est devenue endémique à Madagascar, surtout si ces tiques malgaches transmettent le virus de la PPA d'une manière transovarienne comme celle des spécimens d'*O. moubata* et *O. porcinus* d'Afrique (**Plowright 1970, 1974 ; Rennie 2001**). Si c'est le cas, la prévalence d'infection par le virus serait en phase exponentielle. Par conséquent, leur présence rendrait difficile les propositions de mesures de contrôle et de lutte contre la PPA ainsi que l'éradication de cette maladie à Madagascar. Il est donc nécessaire de vérifier expérimentalement si cette transmission transovarienne existe chez les tiques molles *O. porcinus domesticus* malgaches, car ce constat n'avait jamais été vérifié pour Madagascar.

Les potamochères semblent jouer un rôle négligeable dans l'épidémiologie de la PPA à Madagascar car la probabilité de trouver le virus chez eux est très faible, voire même nulle. C'est pourquoi d'autres études portant sur un plus grand nombre d'échantillons demeurent cependant nécessaires pour estimer avec exactitude la prévalence ou l'absence de la PPA ou des autres maladies porcines chez les potamochères. Pour le moment, les potamochères représentent un risque faible pour les porcs domestiques, qui pourraient en revanche leur transmettre la PPA. Cette situation est un petit avantage pour les éleveurs malgaches : elle indique que des mesures appropriées, bien que contraignantes, pourraient encore éliminer la maladie de l'île.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. (OIE), 2008. Immediate notification report. Report, **Ref OIE: 7536**.
2. **Bastos, A.D.S., Penrith, M.L., Crucière, C., Edrich, J.L., Hutchings, G., Roger, F., Couacy-Hymann, E. and Thomson, G.R.** 2003. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation p. 693-706, Archives of virology, vol. 148, number 4 /mars 2003.
3. **Anderson, E. C., Hutchings, G. H., Mukarati, N. and Wilkinson, P.J.** 1998. African swine fever virus infection of the bushpig (*Potamochoerus porcus*) and its significance in the epidemiology of the disease. Veterinary Microbiology **62**: 1-15.
4. **Andrianjakarivelo, V.** 1999. Etude pr liminaire sur la population des sangliers dans la R serve Sp ciale de Nosy Mangab  et le Parc National Masoala. Wildlife Conservation Society, Antananarivo: 19 pp.
5. **Arias, M. and S nchez-Vizcaino, J.M.** 2002. African Swine Fever. In: Morilla A, Yoon KJ, Zimmerman JJ, editors. Trends in emerging viral infections of swine. Iowa State University Press: p.119–124.
6. **Arias, M. L., Pastor, M.J., Escribano, J.M. and S nchez-Vizcaino, J.M.** 1993. African swine fever diagnosis. Role of the new test. In: A. Galo, Editor, African swine fever, EUR 14209EN, Proc. workshop for coordination of agricultural research 185.
7. **Lubisi, B.A., Darwka, R.M., Meenowa, D. and Jaumally, R.** 2009. An investigation into the first outbreak of African swine fever in the Republic of Mauritius. Transboundary and Emerging Diseases **56**: 178-188.
8. **Babalobi, O.O., Olugasa, B.O., Oluwayelu, D.O., Ijagbone, I.F., Ayoade G.O. and Agbede, S. A.** 2007. Analysis and evaluation of mortality losses of the 2001 African swine fever outbreak, Ibadan, Nigeria. Trop. Anim. Health Prod. **39**: 533–542.
9. **Basto, A.P., Portugal, R.S., Nix, R.J., Cartaxeiro, C., Boinas, F., Dixon, L.K., Leitão, A., Martin, C.** 2006. Development of a nested PCR and its internal control for the detection of African swine fever virus (ASFV) in *Ornithodoros erraticus*. Arch. Virol. **151**: 819–826.
10. **Black, W. C., Piesman, J.** 1994. Phylogeny of hard and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. Evolution **91**: 10034-10038.
11. **Blasco, R., Aguerro, M., Almendral, J.M. and Vinuela, E.** 1989. Variable and constant regions in African swine fever virus DNA. Virology **168**: 330-338.
12. **Bool, P., Ordas, A., S nchez-Botija, C.** 1969. The diagnosis of African swine fever by immunofluorescence. Bull. OIE **72**: 819-839.

13. **Bück, G.** 1949. Tiques des animaux domestiques à Madagascar. Arch. Institut Pasteur, Tananarive, 1949. Rapport annuel pour 1948:60-63.
14. **Carascosa, A. L., Del Val, M., Santarèn, J.F. and Viñuela, E.** 1985. Purification and properties of ASFV. J. Virol **54**: 337-344.
15. **Carillo, C., Borca, M.V., Afonso, C., Onisk, D.V. and Rock, D.L.** 1994. Long term persistent infection of swine monocytes and macrophages with African swine fever virus. Journal of virology **68**: 580-583.
16. **Carrasco, L., Chacon, M. et al.** 1996. Virus association with lymphocytes in acute African swine fever Vet. Res. **27**:305-312.
17. **Carrascosa, J. L., Carazo, J.M., Carrascosa, A.L., Garcia, N., Santisteban, A. and Vinuela, E.** 1984. General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles. Virology **132**:160-172.
18. **Cobbold, C., Wileman, T.** 1998. The major structural protein of African swine fever virus, p73, is packaged into large structures, indicative of viral capsid or matrix precursors, on the endoplasmic reticulum. J. Virol **72**: 5215-5223.
19. **Colas-Belcour, J., Néel, R. et Vervent, G.** 1952. Contribution à l' étude de la transmission du spirochète de la fièvre récurrente malgache (*Borrelia duttoni*) par les *Ornithodoros moubata* de même origine. Bull. Soc. Path. Exot. **45**: 69-78.
20. **Costard, S., Porphyre, V., Messad, S., Rakotondrahanta, S., Vidon, H., Roger, F., Pfeiffer, D.U.** 2009. Multivariate analysis of management and biosecurity practices in smallholder pig farms in Madagascar. Preventive Veterinary Medicine. **92** (3): 199-209.
21. **Costard, S., Wieland, B., de Glanville, W., Jori, F., Rowlands, R., Vosloo, W., Roger, F., Pfeiffer, D.U., Dixon, L.K.** 2009. African swine fever: how can global spread be prevented? Phil. Trans. R. Soc. B, **364**, 2683–2696.
22. **Crucière, C.** 2003. Peste Porcine Africaine. In : Lefèvre, P.C., Blancou, J., Chermette, R. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail ; Europe et régions chaudes. **1**: 735-746.
23. **De la Vega, I. G., Blasto, A., Calvo, R. and Viñuela, E.** 1994. Nucleotide Sequence and Variability of the Inverted Terminal Repetitions of African swine fever virus DNA. Virology **201**: 152-156.
24. **De Tray, D. E.** 1957. African swine fever virus in warthogs (*Phacochoerus aethiopicus*). J. Vet. Med. Assoc. **130**: 537-540.
25. **Dixon, L. K., Abrams, C.C., Miskin, J.E. and Parkhouse, R.M.E.** 1999. African swine fever virus: can current research lead to vaccine development? Outlook Agr. **28**: 187–194.

26. **Dixon, L. K., Escribano, J.M., Martins, C., Rock, D.L., Salas, M. L. and Wilkinson, P.J.** 2005. Asfarviridae. In: Fauquet, C. M., M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball (Eds). Virus Taxonomy, VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, London: 135–143.
27. **Dixon, L. K., Twigg, S.R.F., Baylis, S.A., Vydelingum, S., Bristow, C., Hammond, J.M. and Swith, G.L.** 1994. Nucleotide-sequence of a 55 kbp refion from the right end of the genome of a pathogenic African swine fever virus isolate (Malawi Lil 20/1). J. Genet. Virol **75**: 655-1684.
28. **Anderson, E.C., Hutchings, G. H., Mukarati, N. and Wilkinson, P.J.** 1998. African swine fever virus infection of the bushpig (*Potamochoerus porcus*) and its significance in the epidemiology of the disease. Vet. Microbiol. **62(1)**: 1-15.
29. **Endris, R. G., Haslett, T. M., Hess, W. R.** 1991. Experimental transmission of African swine fever virus by the tick *Ornithodoros* (Alectorobius) *puertoricensis* (Acari: Argasidae). J. Med. Entomol. **28**: 854–858.
30. **Escofier, B., Pages, J.** 1994. Multiple Factor Analysis (Afmult Package). Computational Statistics & Data Analysis **18**: 121-140.
31. **Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution **39**:783-791.
32. **Franco, S.** 2007. Epidémiologie de la peste porcine africaine dans la région du Lac Alaotra (Madagascar). Etude des facteurs de risque et estimation de la prévalence. THESE pour l'obtention de grade de Docteur vétérinaire: 127pp.
33. **Galtier, N., Gouy, M., Gautier, C.** 1996. SEAVIEW and PHYLO_WIN: twographic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. Comput. Appl. Biosci. **12**.
34. **Gomez-Villamandos, J., Bautista, M., Hervas, J. et al.** 1996. Sub-cellular changes in platelets in acute and subacute African swine fever J. Comp. Pathol. **59**: 146-151.
35. **Gomez-Villamandos, J., Hervas, J., Mendez, A., Carrasco, L., Villeda, C., Wilkinson, P. and Sierra, M.** 1995. Experimental African swine fever: apoptosis of lymphocytes and virus replication in others cells. J.Gen.Virol. **76**: 2399-2405.
36. **Gonzague, M. Roger, F., Bastos, A., Burger C., Randriamparany, T., Smondacks, S., Cruciere, C.** 2001. Isolation of a non-haemadsorbing, non-cytopathic strain of African swine fever virus in Madagascar. Epidemiol. Infect. **126(3)**: 453-459.
37. **Goutard, F.** 1999. Investigations épidémiologiques sur le potamochoère et son rôle dans le maintient de la PPA à l'état enzootique à Madagascar. CEAV Pathologie Tropicale, Montpellier: 41pp.
38. **Groocock, C.M., Hess, W.R., Gladney, W.J.** 1980. Experimental transmission of African swine fever virus by *Ornithodoros coriaceus*, an argasid tick indigenous to the United States. Am. J. Vet. Res. **41**: 591–594.

39. **Halos, L., Jamal, T., Vial, L., Maillard, R., Suau, A., Le Menach, A., Boulouis, H.J., Vayssier-Taussat, M.** 2004. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Vet. Res.* **5**: 1-18.
40. **Haresnape, J. M., Wilkinson, P.J., Mellor, P.S.** 1988. Isolation of African swine fever virus from ticks of the *Ornithodoros moubata* complex (Ixodoidea: Argasidae) collected within the African swine fever enzootic area of Malawi. *Epidemiol. Infect.* Volume **101**:173-185.
41. **Hess, W. R., Endris, R. G., Haslett, T. M., Monahan, M. J., McCoy, J. P.** 1987. Potential arthropod vectors of African swine fever virus in North America and the Caribbean basin. *Vet. Parasitol.* **26**: 145–155.
42. **Heuschele, W. P., Coggins, L.** 1969. Epizootiology of African swine fever virus in warthogs. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.* **17**:179–183.
43. **Heuschele, W. P., Coggins, L.** 1965. Isolation of African swine virus from a giant forest hog. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.* **13**: 255-256.
44. **Hoogstraal, H.** 1962. Description of *Ornithodoros* (Reticulinassus) *madagascariensis* sp. (Ixodoidea, Argasidae). *Acarologia* **4, 2**: 185-189.
45. **Humbert, C.** 2007. Etude épidémiologique de la peste porcine africaine dans la région de Marovoay (Madagascar). Etude de la filière porcine selon une approche participative et étude de prévalence. Certificat d'études approfondies vétérinaires. Pathologies animales en régions chaudes: 61pp.
46. **Iyer L.A., Balagi, S., Koonin E.V., Aravind, L.** 2006. Evolutionary genomics of nucleo-cytoplasmic large DNA viruses. *Virus Res.* **117**:156-184.
47. **Kleiboeker, S. B., Burrage, T.G., Scoles, G.A., Fish, D., Rock, D.L.** 1998. African swine fever virus infection in the argasid host, *Ornithodoros porcinus porcinus*. *J. Virol* **72**:1711-1724.
48. **Lamoureux, A.** 1913. Présence d'*Ornithodoros moubata* dans un foyer de fièvre récurrente à la côte ouest de Madagascar. *Bull. Soc. Path.exot.* **6**: 146-149.
49. **Fukunaga, M., Uschijima, Y., Aoki, Y., Talbert, A.** 2001. Detection of *Borrelia duttoni*, a tick-borne relapsing fever agent in Central Tanzania, within ticks by flagellin gene-based nested polymerase chain reaction. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **1**: 331-338.
50. **Malmquist, W.A., Hay, D.** 1960. Hemadsorption and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures *Am. J. Vet. Res* **21**: 104-108.
51. **Mc Daniel, H. A.** 1986. African swine fever In: Leman Glock, A. D., Mengeling, R.D.W.L., Penny, R.H.C., Scholl, E., Straw, B., Eds. *Diseases of swine*. 6th Edition. Ames, IA, USA, Iowa University Press, 237-245.

52. **McVicar, J. W.** 1984. Quantitative aspects of the transmission of African swine fever. *Am. J. Vet. Res* **45**: 1535–1541.
53. **Mebus, C. A., Dardiri, A.H.** 1979. Additional characteristics of disease caused by the African swine fever viruses isolated from Brazil and Dominican Republic. *Proc. Annu. Meet. US. Anim. Health. Assoc.* **83**: 227-239.
54. **Melander, Y. M., H. E.** 1980. Chromosome studies in African wild pigs (Suidae, Mammalia). *Hereditas*, **92 (2)**: 283-289.
55. **Mellanby, K.** 1935. The structure and function of the spiracles of the tick *Ornithodoros moubata* Murray. *Parasitology*, 288-290.
56. **Miller, B. R., Loomis, R., Dejean, A., Hoogstraal, H.** 1985. Experimental studies on the replication and dissemination of Qalyub virus (Bunyaviridae: Nairovirus) in the putative tick vector, *Ornithodoros (Pavloskyella) erraticus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**: 180-187.
57. **Montgomery, R.** 1921. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya colony). *J. Comp. Pathol* **34**: 159, 191, 243-262.
58. **Morel, P. C.** 1969. Les tiques d'Afrique et du bassin Méditerranéen (Ixodoidea). Distribution, biologie, écologie, rôle pathogène. [Published in CD ROM in 2003]. Montpellier (France): Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement Elevage Médecine Vétérinaire Tropicale.
59. **Moulton, J. and C., L.** 1968. Comparison of lesions in acute and chronic African swine fever. *Cornell Vet.* **58**:364-388.
60. **Néel, R., Payet, M. et Gonnet, C.** 1949. La fièvre récurrente à tiques à Madagascar. Historique. Etat actuel de la question. *Bull. Soc.Path. Exot.* **42**: 384-392.
61. **Nzietchueng, S.** 2005. Description de la pathologie ovine à l'aide de l'épidémiologie participative dans la région du lac Alaotra (Madagascar). CEAV : Pathologie Animale en Régions Chaudes : Toulouse, ENVT: 57pp.
62. **Oleaga-Perez, A., Perez-Sánchez, R., and Encinas-Grandes, A.** 1990. Distribution and biology of *Ornithodoros erraticus* in parts of Spain affected by African swine fever. *Vet. Rec.* **126**: 32-37.
63. **Oura, C. A. L. and Arias, M.** 2008. African swine fever. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 6th edn. OIE, Paris.
64. **Oura, C. A. L., Powel, P.P., Anderson, E. and Parkhouse, R.M.** 1998. The pathogenesis of African swine fever in the resistant bushpig. *J.Gen.Virol.* **79**: 1439-1443.
65. **Parker, J., Plowright, W., Pierce, M.A.** 1969. The epizootiology of African swine fever in Africa. *Vet. Rec* **85**: 668-674.

66. **Penrith, M. L., Thomson, G.R. and Bastos, A.D.S.** 2004. African swine fever. In: Coetzer, J. A. W., and R. C. Tustin (eds). *Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*, 2nd edn. Oxford University Press, Cape Town, London, New York: 1087–1119.
67. **Plowright, W.** 1981. African swine fever. In *Infectious diseases of wild mammals*. 2nd ed. J. W. Davis, L. H. Karstad & D. O. Trainer (ed.). Iowa State University Press, Ames, Iowa: 178-190.
68. **Plowright, W., Parker, J. and Peirce, M.A.** 1969. African Swine Fever Virus in Ticks (*Ornithodoros moubata*, Murray) collected from Animal Burrows in Tanzania. *Nature* **221**: 1071-1073.
69. **Plowright, W., Perry, C.T. and Greig, A.** 1974. Transmission of African swine fever virus in the tick, *Ornithodoros moubata porcinus*, Walton. *Res. Vet. Sci.* **17**(1): 106-113.
70. **Plowright, W., Perry, C.T., Greig, A.** 1974. Sexual transmission of African swine fever virus in the tick *Ornithodoros moubata porcinus*, Walton. *Res. Vet. Sci.* **17**: 106-113.
71. **Plowright, W., Perry, C.T., Peirce, M.A.** 1970. Transovarial infection with African swine fever virus in the argasid tick, *Ornithodoros moubata porcinus*, Walton. *Res. Vet. Sci.* **11**: 582-584.
72. **Plowright, W., Thomson, G.R., Nesser, J.A.** 1994. African swine fever In: Coetzer J., Thomson, G., Tustin, R. Eds. *Infectious diseases of livestock*. Oxford, UK, Oxford University Press: 568-599.
73. **Plowright W., Parker, J.** 1967. The stability of African swine fever virus with particular reference to heat and pH inactivation. *Archiv für die gesamte Virusforschung* **21**: 383-402.
74. **Ravaomanana, J., Michaud, V., Jori, F., Andriatsimahavandy, A., Roger, F., Albina, E., Vial, L.** 2010. First detection of African Swine Fever Virus in *Ornithodoros porcinus* in Madagascar and new insights into tick distribution and taxonomy. *Parasite and vectors*, **3/115**, 9pp.
75. **Ravaomanana, J., Jori, F., Vial, L., Pérez-Sánchez, R., Blanco, E., Michaud, V., Roger, F.** 2011. Assessment of interactions between African swine fever virus, bushpigs (*Potamochoerus larvatus*), *Ornithodoros* ticks and domestic pigs in north-western Madagascar. *Transboundary and Emerging Diseases*, **58**(3), 247-254.
76. **Roger, F., Ratovonjato. J., Vola, P., Uilenberg, G.** 2001. *Ornithodoros porcinus* ticks, bushpigs, and African swine fever in Madagascar. *Exp. Appl. Acarol.* **25**(3): 263-269.
77. **Rousset, D., Randriamparany, T., Maharavo-Rahantamalala, C.Y., Randriamahefa, N., Zeller, H., Rakoto-Andrianarivelo, M., Roger, F.** 2001.

- African swine fever introduction into Madagascar, history and lessons from an emergence. Arch. Inst. Pasteur Madagascar **67(1-2)**: 31-33.
78. **Ruiz-Gonzalvo, F., Rodriguez, F., Escribano, J.M.** 1996. Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus. Virology **218**: 285-289.
 79. **Sànchez-Vizcaino, J. M.** 1992. African swine fever. In: Leman, A. D., Straw, B. E., Mengeling, W.L., D'Allaire, S., Taylor, D.J. Diseases of swine. 7th Edition. London: 228-236.
 80. **Sànchez-Botija, C.** 1982. African swine fever. New developments, Rev. Sci. Tech. OIE **1**: 1065-1094.
 81. **Sànchez-Botija, C.** 1963. Reservorios del virus de la peste porcina africana: Investigación del virus de la PPA en los artropodos mediante la prueba de la hemoadsorpcion, p. 895-899, Bull. OIE vol. 1.
 82. **Sànchez-Vizcaino, J. M.** 2006. African swine fever. Diseases of swine, 9th Edition. Blackwell Publishing **13**: 291-298.
 83. **Sánchez-Vizcaíno, J. M.** 1999. African swine fever. In A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. Dallaire, and D. J. Taylor (ed.), Diseases of swine, 8th ed. Iowa State University Press, Ames. **93-102**.
 84. **Sànchez-Vizcaino, J. M., Tabares, E., Salvador, E. et al.** 1982. Semi purified structural viral protein for the detection of African swine fever antibodies by indirect ELISA technique. Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci. **22**:214-222.
 85. **Sànchez Botija, C., Ordas, A. and Gonzales, J.G.** 1970. Indirect immunofluorescence for the investigation of African swine fever antibodies. Its value for diagnosis. Rev. Patron. Biol. Anim. **14**: 159-180.
 86. **Seydack, A. H. W.** 1990. Ecology of the bushpig *Potamochoerus porcus* Linn. 1758 in the Cape province, South Africa. PhD Thesis Department of Forestry, University of Stellenbosch, Knysna, S.A: 727.
 87. **Simoons, F. J.** 1953. Notes on the bushpig (*Potamochoerus*). Uganda Journal **17**: 80-81.
 88. **Thomson, G. R.** 1985. The epidemiology of African swine fever: the role of free-living hosts in Africa. J. Vet. Res. **52(3)**: 201-209.
 89. **Thomson, G. R., Gainaru, M.D., Van Dellen, A.F.** 1980. Experimental infection of warthog (*Phacochoerus aethiopicus*) with African swine fever virus. Onderstepoort J Vet Res, **47**, 19-22.
 90. **Uilenberg, G.** 1963. Existence d'*Ornithodoros porcinus* Walton, 1962 (Argasidae) à Madagascar. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays. trop. **16**: 147-150.

91. **Van Der Merwe, S.** 1968. Some remarks on the "tampan" of the *Ornithodoros moubata* complex in Southern Africa. Zool. Anz. **181**: 280-289.
92. **Vercammen, P., Seydack, A. H. W. & Oliver, W. L. R.** 1993. The Bush Pigs (*Potamochoerus porcus* and *P. larvatus*). In Pigs, Peccaries and Hippos. W. L. R. Oliver (ed.). IUCN, Gland, Switzerland. 93-100.
93. **Vial, L.** 2009. Biological and ecological characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. Parasite. **16**: 191-202.
94. **Vial, L., Durand, P., Arnathau, C., Halos, L., Diatta, G., Trape, J.F., Renaud, F.** 2006. Molecular divergences of the *Ornithodoros sonrai* soft tick species, a vector of human relapsing fever in West Africa. Microbes and Infection **8**: 2605-2611.
95. **Vial, L., Wieland, B., Jori, F., Etter, E., Dixon, L. and Roger, F.** 2007. African swine fever Virus DNA in Soft Ticks, Senegal. Emerging Infectious Diseases **13 (12)**: 1928-1931.
96. **Walton, G. A.** 1962. The *Ornithodoros moubata* super species problem in relation to human relapsing fever epidemiology. Symp. Zool. Soc. Lond. **6**: 83-156.
97. **Wardley, R. C., de M Andrade, C, Black, DN., de Castro Portugal, F.L., Enjuanes, L., Hess, W.R., Mebus, C., Ordas, A., Rutili, D., Sánchez Vizcaino, J., Vigario, J.D., Wilkinson, P.J., Moura Nunes, J.F. and Thomson, G.** 1983. African swine fever virus. Brief review. Arch. Virol **76(2)**: 73-90.
98. **Wilkinson, P. J.** 1989. African swine fever virus. Virus infections of porcines **2**: 17-35.
99. **Wilkinson, P. J. and Wardley, R.C.** 1978. The replication of ASFV in pig endothelial cells. Br. Vet. J. **134**: 280-282.
100. **Yanez, R. J., Rodriguez, J.M., Nogal, M.L., Yuste, L., Enriquez, C., Rodriguez, J.F. and Viñuela, E.** 1995. Analysis of the complete nucleotide sequence of the ASFV. Virology **208**: 249-278.

ANNEXES

ANNEXES 1

| |
|------------------------------|
| <h3>Publications</h3> |
|------------------------------|

RESEARCH

Open Access

First detection of African Swine Fever Virus in *Ornithodoros porcinus* in Madagascar and new insights into tick distribution and taxonomy

Julie Ravaomanana¹, Vincent Michaud², Ferran Jori³, Abel Andriatsimahavandy⁴, François Roger³, Emmanuel Albina², Laurence Vial^{2*}

Abstract

Background: African Swine Fever Virus has devastated more than the half of the domestic pig population in Madagascar since its introduction, probably in 1997-1998. One of the hypotheses to explain its persistence on the island is its establishment in local *Ornithodoros* soft ticks, whose presence has been reported in the past from the north-western coast to the Central Highlands. The aim of the present study was to verify such hypothesis by conducting tick examinations in three distinct zones of pig production in Madagascar where African Swine Fever outbreaks have been regularly reported over the past decade and then to improve our knowledge on the tick distribution and taxonomy.

Results: *Ornithodoros* ticks were only found in one pig farm in the village of Mahitsy, north-west of Antananarivo in the Central Highlands, whereas the tick seemed to be absent from the two other study zones near Ambatondrazaka and Marovoay. Using 16S rDNA PCR amplification and sequencing, it was confirmed that the collected ticks belonged to the *O. porcinus* species and is closely related to the *O. p. domesticus* sub-species Walton, 1962. ASFV was detected in 7.14% (13/182) of the field ticks through the amplification of part of the viral VP72 gene, and their ability to maintain long-term infections was confirmed since all the ticks came from a pig building where no pigs or any other potential vertebrate hosts had been introduced for at least four years.

Conclusions: Considering these results, *O. porcinus* is a reservoir for ASFV and most likely acts as vector for ASFV in Madagascar, but its apparent restricted distribution may limit its role in the epidemiology of the disease in domestic pigs.

Background

African Swine Fever (ASF) is one of the most serious diseases in domestic pigs. It is caused by a DNA virus of the *Asfarviridae* family and usually results in acute haemorrhagic fever in susceptible animals with possibly up to 100% mortality in naïve pig herds [1]. No treatment or vaccine is currently available, and control is essentially based on preventive sanitary measures and a better knowledge of the epidemiological patterns [1,2]. ASF is enzootic in most sub-Saharan countries and its propagation is considered to be a major risk for other countries.

Several introductions have been reported in the past in West Africa, Europe and the Americas, as well as more recent re-emergences of the disease in the Indian Ocean and the Caucasus [2,3].

ASF is highly contagious and is transmitted by direct contact between infected pigs and susceptible ones or by contact with infectious secretions/excretions. The virus is highly resistant in tissues and the environment, contributing to its transmission over long distances through swill feeding and fomites (e.g., contaminated material, vehicles or visitors to pig premises). In addition, African Swine Fever Virus (ASFV) can be transmitted by soft ticks of the genus *Ornithodoros*, which may either colonise pig pens in domestic areas or mammal burrows in the wild [4-6]. Considering their capacity to replicate and to maintain the virus over the years

* Correspondence: laurence.vial@ciad.fr

²Centre of International Cooperation in Agricultural Research for Development (CIAD), CMAEE Unit, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

Full list of author information is available at the end of the article



and to transmit the virus "from tick-to-tick" during mating and development stages [7-10], they are also considered excellent reservoirs of ASFV, just like wild African suids (e.g., warthogs, bush pigs and giant forest hogs). Enzootic ASF has been closely linked to the existence of *Ornithodoros* tick hosts interacting with wild suids, with *O. moubata* and *O. porcinus* ticks from the *O. moubata* species complex in East and Southern Africa [5,11], with *O. erraticus* in the Iberian Peninsula [6] and perhaps with *O. sonrai* in Senegal [12].

ASFV was probably introduced into Madagascar in 1997-1998, from the south-eastern coast of Mozambique to the south-western part of the island, with a subsequent and rapid spread to other regions [13,14]. This epizootic disease devastated more than half of the domestic pig population in Madagascar, with severe economic consequences for the local pork meat market [14]. It then evolved into an epi-enzootic pattern, with different hypothetical causes such as the adaptation of ASFV to local resistant pig populations or its establishment and persistence in native bush pigs and local *Ornithodoros* ticks, supplemented by the lack of reliable sanitary measures to control ASFV epizootic foci. The existence of bush pigs has been confirmed in forested areas of north-western, southern and eastern regions of Madagascar [15], which are considered particularly interesting interface areas for investigating the links between the ASFV sylvatic and domestic cycles. For ticks, specimens from the *O. moubata* species complex, formerly identified as *O. moubata*, were known to be present in human houses from north-western coast to Central Highlands of Madagascar and suspected of transmitting human relapsing fever [16-21]. Then, based on morphological descriptions from Walton [22], Uilenberg compared these ticks to some specimens more recently collected in pig pens and concluded that both actually corresponded to the *O. porcinus* species [23]. Finally, during the epizootic phase in 2000 following ASFV introduction, *O. porcinus* was collected in pig pens in the Antananarivo region, suggesting a possible close contact between this tick and infected pigs and a potential persistence of ASFV in *O. porcinus* tick hosts [24]. To date, no more investigations have been conducted, except the preliminary testing of 271 domestic pig sera in 2006 using an ELISA test to detect anti-*O. moubata* saliva antibodies [25,26]. This test detected 1.1% of positive sera and 39.1% of sera were considered doubtful, near Marovoay, Ambatondrazaka and Antananarivo (Ravaomanana and Vial, unpublished data).

The aims of the present work were: (i) to confirm the current presence of *O. porcinus* in pig pens in Madagascar and to better understand its geographical distribution patterns; (ii) to clarify its taxonomy and determine its phylogenetic relationships to known African

Ornithodoros species and subspecies; and (iii) to detect natural long-term infections by ASFV in the Malagasy *O. porcinus* and to evaluate its potential role in ASFV domestic cycle of transmission in Madagascar.

Methods

Study zones and periods for field investigations

Three study zones (Antananarivo, Ambatondrazaka and Marovoay) (Figure 1) were selected and tick examinations in pig pens were conducted during the dry season from July to December in 2006 (Marovoay) and 2007 (Antananarivo and Ambatondrazaka). Only four additional farms were visited in 2008 in the Antananarivo zone to investigate the local distribution of *O. porcinus*. The three zones had large pig populations (from 8% in the Ambatondrazaka zone to 40% in the Antananarivo zone of the total Malagasy pig population) and ASF outbreaks had been regularly reported on farms, with an estimated incidence ranging from 15.2% to 42.5%, depending on the area (Costard, personal communications). Pig production systems varied from traditional small farms in the Marovoay and Ambatondrazaka zones to more industrialised practices for commercial purposes in the Antananarivo zone.

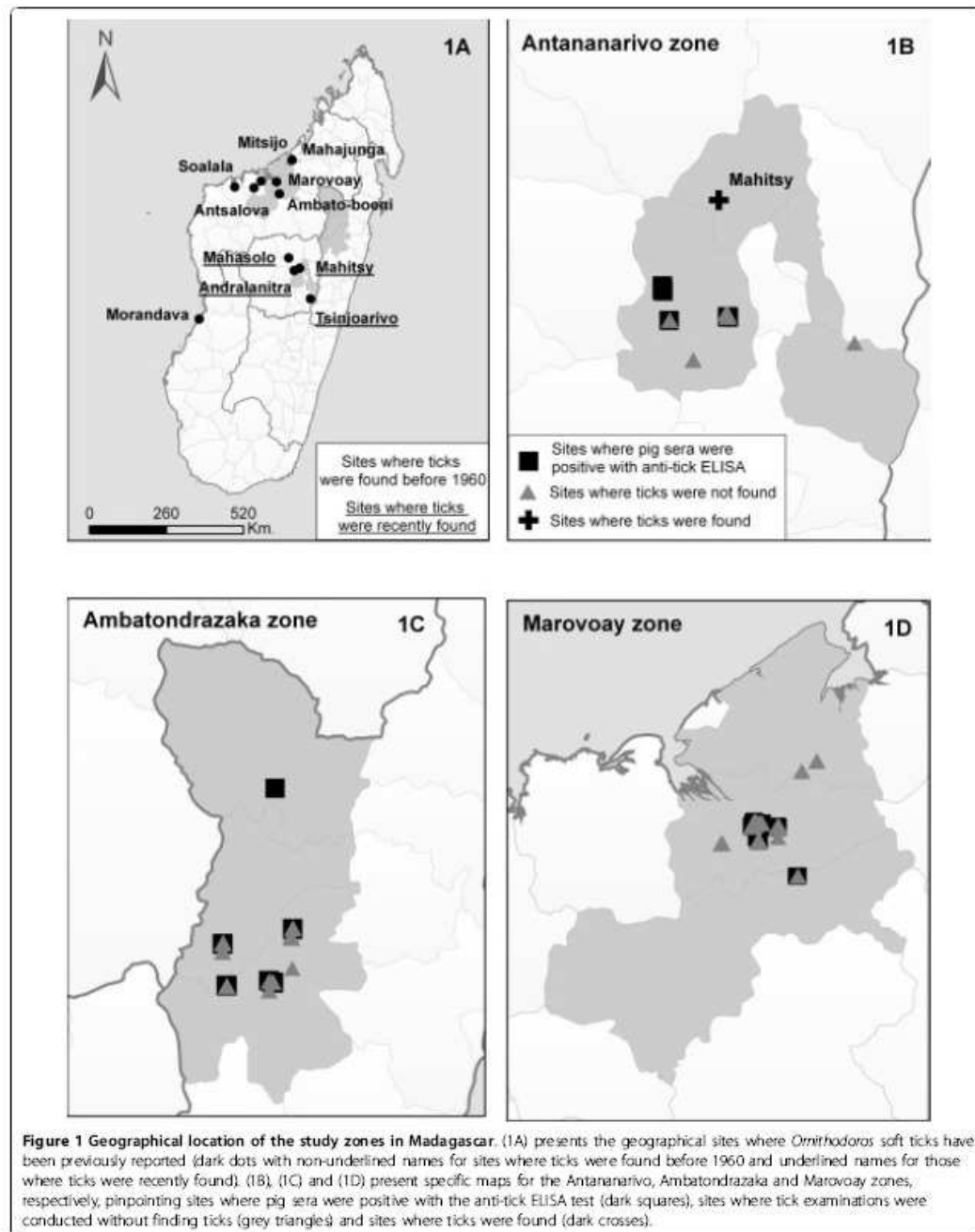
The Marovoay zone consists of a dry and hot tropical coastal zone, characterised by a dry climate throughout the year. The presence of *O. porcinus* (formerly *O. moubata*) has been reported on the west coast from Mahajunga to Morondava since the 18th century by Drury and confirmed by many authors in the first half of the 20th century [16-21]. However, more recent investigations suggested their quasi extinction since the 1950 s, at least from Soalala to Mahajunga [24,27].

The Ambatondrazaka zone consists of a wet and hot tropical coastal area. The climate is characterised by rainfall throughout the year, especially from December to March. The presence of soft ticks has never been demonstrated in this zone.

The Antananarivo zone consists of highlands characterised by a high-altitude climate, with a hot and wet season from October to February and a dry and cold season from March to September. Although altitude is usually considered unsuitable for the presence of *Ornithodoros* ticks [28], specimens of *O. porcinus* were found inside human and animal houses from the 1960 s to 1980 s in Mahasolo, 150 km from Antananarivo [23,27], and in 2000 in Mahitsy, Andranitra and Tsinjoarivo, north-west of Antananarivo and south of Antananarivo, respectively [24].

Tick collections in pig pens

In the Marovoay and Ambatondrazaka zones, a random cluster sampling by villages was conducted. The sample size (i.e., the number of farms to be examined in each



village of the study zone) was determined using the "Detection of disease" module of the WINEPISCOPE 2.0. software (free download at <http://www.clive.ed.ac.uk/winepiscope>). It was based on the estimated total number of pig farms and the estimated proportion of pig farms to be detected as infested by *O. porcinus*, with a confidence interval of 95%. The villages examined for tick presence were selected from a preliminary farm census taken in 2006 in the three study zones for domestic pig sampling and were, as much as possible, homogeneously distributed within each study zone. An estimated prevalence of infestation of 30% was used based on previous studies conducted on *Ornithodoros* ticks colonizing pig farms in Spain and Africa [5,6]. For the Antananarivo zone, we targeted pig farms that were known to be infested in 2000 [24]. Random sampling was then conducted in the Arivonimamo village (Figure 1). For the three study zones, one quarter of pig farms that were included in the random sampling were previously detected positive or doubtful using the anti-tick ELISA test in 2006. Finally, if the presence of *O. porcinus* was confirmed, local investigations were conducted around infested farms in order to determine local tick distribution patterns and the size of tick foci.

Ticks were manually extracted from accessible crevices, small holes and external structures of pig pens, whereas deeper fissures were examined using a portable gasoline-powered vacuum cleaner adapted for burrow-dwelling ticks [29]. The content of the collected dust was laid out in a white tray and exposed to the sun in order to collect *Ornithodoros* soft ticks that are photophobic [30]. Live ticks were placed in small plastic boxes, each of them containing a wet piece of filter paper to maintain a relative humidity suitable for tick survival. In the laboratory, ticks were stored at -80°C until analysis.

Molecular analyses on ticks

O. porcinus ticks collected during the study, as well as specimens available from previous samplings in 2000, were identified according to morphological features, sex and developmental stage [22,23]. After three washings in 1% PBS, a tick homogenate was obtained for each specimen by crushing the tick in 1 ml of MEM supplemented with 50 U/ml of penicillin, streptomycin and fungizone in a 1.5-ml Eppendorf tube. Tick homogenates were frozen twice at -70°C overnight and then vortexed, to facilitate DNA accessibility before storage at -70°C.

For molecular use, tick homogenates were centrifuged and DNA extraction was carried out on 200 µL of the supernatant using Phenol Chloroform [31]. In order to test the integrity of the extracted DNA, 16 S rDNA of each tick was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using primers designed specifically for ticks

belonging to the *O. moubata* species complex according to the PCR protocol described by Vial [32]. Positive samples were then tested for ASFV infection using a nested PCR that amplified part of the VP72 gene and that was described by Basto [33]. All PCR products were detected by electrophoresis on 1.5% agarose gel in TAE 1x buffer (40 mM Tris acetate, 2 mM EDTA, pH 8.3) and stained with ethidium bromide.

Phylogenetic analyses

To determine phylogenetic relationships of collected ticks and to confirm ASFV infections, some 16 S rDNA and VP72 PCR products were directly sequenced using an ABI PRISM 3730xl DNA analyser (Cogenix Meylan, France). Sequences were edited and manually aligned using Seaview software [34]. Phylogenetic trees based on molecular sequences were constructed by applying the neighbor-joining (NJ), the parsimony (P) and the maximum likelihood (ML) algorithms of the Phylip software package, using 1000 bootstraps (BS) with random sequence addition [35]. Single deletion was treated as a fifth base. VP72 amplified sequences were compared to the complete sequence of the gene available for the reference ASFV strain BA71V (M34142 in GenBank). For 16 S rDNA alignment, the soft tick *Argas persicus* from the Argasinae sub-family was used as the outgroup (L34321 in GenBank). Available 16 S rDNA sequences of African specimens from the *O. moubata* species complex were included to refine phylogenetic relationships of Malagasy ticks, especially the reference sequences for *O. moubata* sensu strict Murray, 1877 (L34328 in GenBank), *O. porcinus porcinus* Walton, 1962 (L34329 in GenBank) and *O. porcinus domesticus* Walton, 1962 (L34330 in GenBank) published by Black [36].

Results

Presence of *O. porcinus* in Malagasy pig pens

O. porcinus was confirmed in one farm located in Mahitsy (18°45'3"S, 47°20'47"E) in the Antananarivo zone (Figure 1 Figure 2). Four other farms were examined in its 20-2000 m periphery without finding any other ticks (Table 1). No tick was found in the nine additional farms that were visited in the Arivonimamo village from the same zone neither among the 70 farms examined in the two other zones (Table 1). In the first zone, it was no more possible to take samples in the Andralanitra and Tsinjoarivo villages because of the recent destruction of the pig premises. In the Marovoay and Ambatondrazaka zones, sampling was incomplete due to ASF foci occurring during the study period and that prevented to finish field investigations for biosafety reasons. As a result, 40 pig pens were visited in the Marovoay zone instead of the 42 expected, with a confidence level ranging from 90% for Andranofasika to 95%

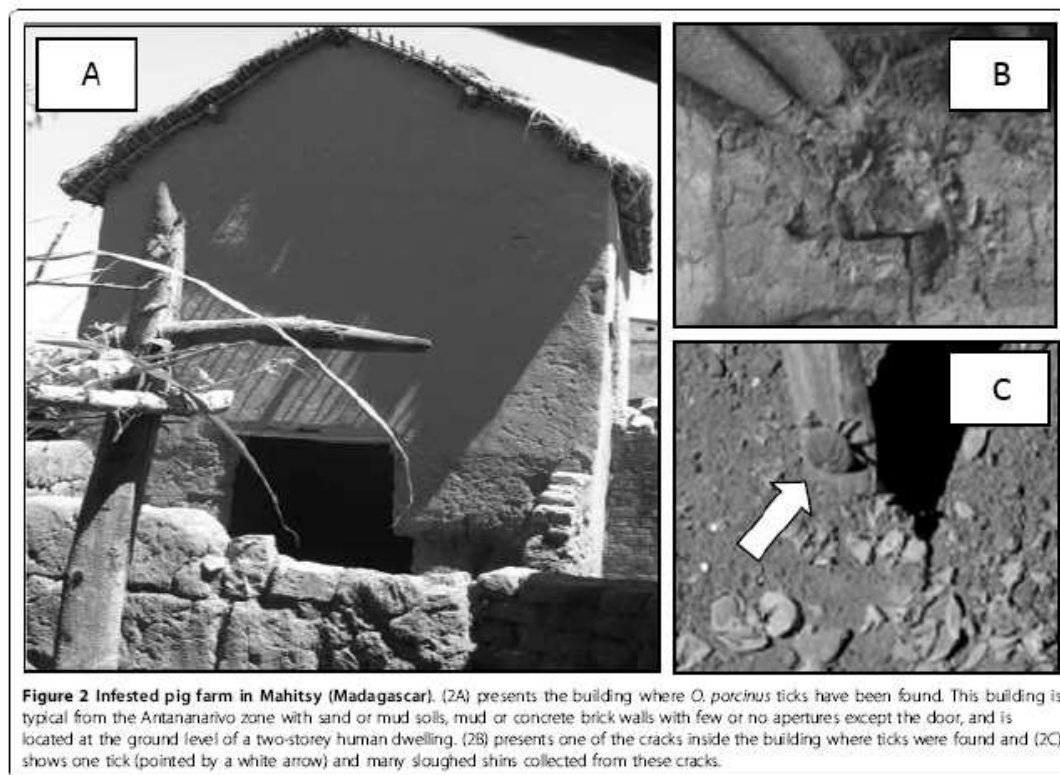


Table 1 Sampling protocol and results for tick examinations on pig farms in the three study zones of Madagascar

| Zone | Village | Aprox. no. of farms per village | Sample size for detection | Visited farms | Confidence level for detection (%) | No. of infested farms per village |
|----------------|------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Marovoay | Marovoay/Ankazomborona | 300-450 | 9 | 9 | 95 | 0 |
| | Manaratsandry | 100-150 | 9 | 9 | 95 | 0 |
| | Andranofasika | 25-50 | 8 | 6 | 90 | 0 |
| | Tsararano | 50-75 | 8 | 8 | 95 | 0 |
| | Bekobay/Tsilakanina | 35-50 | 8 | 8 | 95 | 0 |
| Ambatondrazaka | Bejofo | 100-150 | 9 | 6 | 88 | 0 |
| | Ambatosorotra | 100-150 | 9 | 8 | 94 | 0 |
| | Ambohimandroso | 50-100 | 8 | 7 | 92 | 0 |
| | Ambatondrazaka | 200-250 | 9 | 9 | 95 | 0 |
| Antananarivo | Arivonimamo | 200-250 | 9 | 9 | 95 | 0 |
| | Mahitsy | - | - | 5 | - | 1 |

The table indicates the villages that have been visited, the estimated number of farms to be visited according to the estimated number of existing farms in each village and the real number of farms that have been examined for ticks. Then, the number of infested farms is presented for each village.

for the other villages. In the Ambatondrazaka zone, 30 pig pens were accessible for tick examination instead of the 35 expected, with a confidence ranging from 92% to 95% and decreasing to 88% for Bejofo.

Molecular identification and phylogeny of Malagasy *O. porcinus*

Three 16 S rDNA sequences from ticks collected in 2000 in Mahitsy and three from the same location in 2007-2008 were produced. The amplified sequences were identical among ticks from 2000 (HM588698 in GenBank) and 2007-2008 (HM588699 in GenBank), respectively. 273 bps were aligned with available published sequences for phylogenetic analysis. Ninety-four sites were variable and 44 were parsimony informative for the whole dataset (differences at one site represented in at least two different sequences). Within the *O. moubata* species complex, 50 sites were variables and 22 were parsimony informative. Malagasy ticks from 2000 and 2006-2008 differed by only one substitution. NJ, P and ML trees had the same configuration. The consensus tree from the ML method is shown on Figure 3. The monophyly of the *O. moubata* species complex and the distinction of *O. moubata* sensu stricto and *O. porcinus* were supported by 100% BS values. *O. p. porcinus* and *O. p. domesticus* were differentiated with a 89% BS

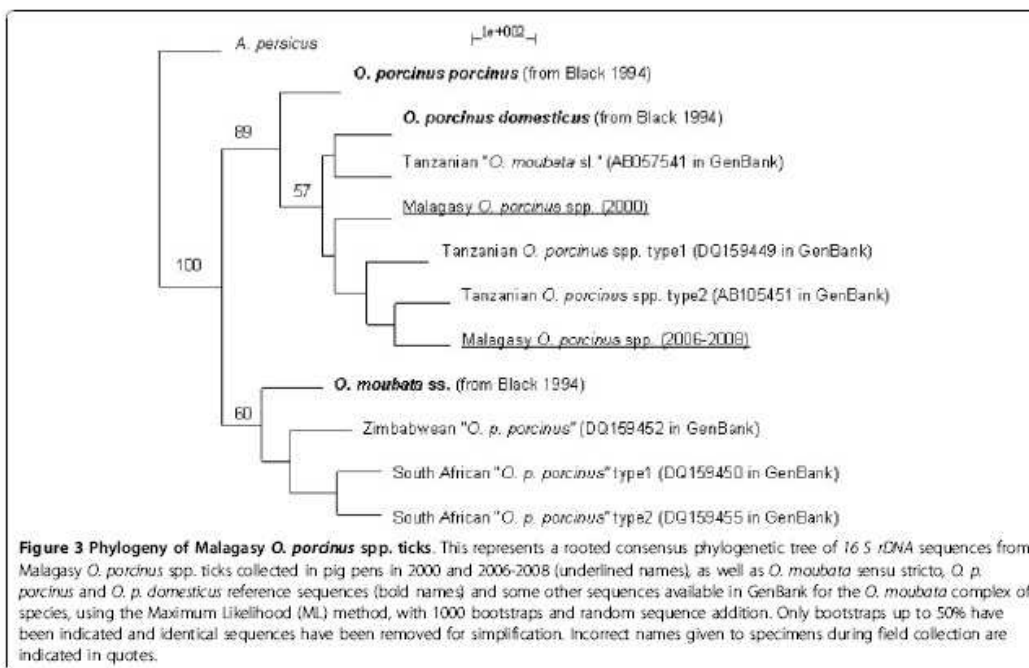
support. Specimens from South Africa and Zimbabwe that were named *O. porcinus* fell into the *O. moubata* sensu stricto group with a 60% BS support. Malagasy ticks were likely related with the reference specimen of *O. p. domesticus* with a 57% BS support, and to Tanzanian ticks collected in the 1980 s and, more recently, in 2003.

Detection of ASFV natural infection in Malagasy *O. porcinus*

Using PCR amplification of the VP72 virus gene, ASFV infection was detected in 13 ticks out of 182 positive ones for 16 S rDNA. All stages and sexes were found to be infected. Two out of 21 tested ticks (9.52% with 95% CI [8.94-10.09]) were positive in 2000 and 11 out of 161 (6.83% with 95% CI [6.34-7.32]) in 2007-2008. The sequencing and the alignment of 243 bps from two amplified fragments (HM588697 in GenBank) confirmed the detection of ASFV since they showed 100% homology with VP72 amplified from BA71V.

Discussion

In this present study, *O. porcinus* was found on a traditional pig farm in Mahitsy in the Antananarivo zone (Madagascar), confirming previous results related to the presence of *O. porcinus* on the island. The fact that



ticks were found in the same pig pen after an interval of seven years, whereas they were absent from other neighbouring farms, suggests their high propensity to establish stable focal tick populations and their low dispersal capacity. These characteristics have been reported for several *Ornithodoros* tick species and are linked both to their endophilous lifestyle and their ability to feed rapidly on their hosts (a few minutes to one hour, at least for nymphs and adults) [28,30]. These ticks colonize nests, burrows and caves of vertebrate animals or cracks and crevices in human and livestock habitats. They reduce possible exposure to unfavourable external conditions by rapidly detaching from their vertebrate hosts before these hosts leave the habitat, and by remaining in their underground sheltered habitat. If potential hosts are absent from the habitat, these ticks are also able to survive for several years without feeding, provided the microclimate of their habitat is sufficiently suitable [30].

Our investigations also confirmed that *O. porcinus* from Madagascar can be infected by ASFV since natural infections with ASFV were detected in about 8% of tick specimens collected from the Mahitsy farm. Since 2004 until now, the owner of this farm has abandoned pig production since any pigs he has introduced in these pig buildings systematically died from ASFV. Thus the detection of infections in ticks collected in 2000 and then in 2007 from the same pig premises without any introduction of potentially infected pigs (the only confirmed susceptible vertebrate hosts for ASFV with wild suids) for at least three years suggested the capacity of long-term persistence of ASFV in Malagasy *O. porcinus*. This is in agreement with previous surveys conducted on African *Ornithodoros* tick vectors concerning virus persistence in the same individuals or among tick populations through transovarial and venereal transmissions [8,9]. For the first time, there is field evidence that *O. porcinus* in Madagascar is a natural reservoir for ASFV that most probably also acts as a competent vector. Experimental transmission studies are needed to verify these assumptions.

Furthermore, we were able to clarify the phylogenetic status of *O. porcinus* ticks that colonise pig pens in Madagascar. As previously suggested by Uilenberg [23], these ticks belong to the *O. p. domesticus* sub-species Walton, 1962, although they share some morphological and genetic characteristics of the closely related *O. p. porcinus* Walton, 1962. They are phylogenetically very close to Tanzanian soft ticks that transmit *Borrelia duttonii*, the agent responsible for human tick-borne relapsing fever in this region [37]. This result suggests that the same *O. porcinus* ticks may be able to maintain and transmit both a human pathogen and an animal pathogen by shifting vertebrate hosts, depending on their

availability in their habitat. This is a typical strategy of indiscriminate host feeders to increase the amount of potential hosts and may be interpreted as an adaptation to their endophilous lifestyle [30].

Finally, the distribution range of *O. porcinus* seems to be limited to tiny heterogeneous populations in Madagascar, since ticks were only found in one village of the Central Highlands and seem to be absent from the Morovoay and Ambatondrazaka zones. If such a restricted geographical range is confirmed, the epidemiological role of *O. porcinus* in the persistence of ASFV in Malagasy domestic pigs may be low. These distribution patterns confirm past studies indicating the quasi extinction of this tick since the 1950 s from the north-western part of the country and the existence of a remaining isolated pocket in the centre of the island today [24,27]. However, they are not consistent with previous serological anti-*O. moubata* ELISA tests conducted in 2006, which suggested the presence of *Ornithodoros* ticks in the three study zones. The intrinsic specificity of this test [26,38] and its reliability for the specific Malagasy situation with the *O. porcinus* species have been questioned. Our target sample size was also not met but the maximum risk to not detect an infested farm did not exceed 12%. In addition, our sampling effort might not have revealed tick presence if the real proportion of infested pig pens was lower than the expected prevalence of 30% established as the threshold in this study. However, this threshold corresponds to the lowest margin that has been observed in endemic African countries and Spain [5,6]. Many interrelated factors may explain the restricted distribution of *O. porcinus* in Madagascar. Cool to hot temperatures from the Marovoay and Ambatondrazaka zones are suitable for the survival and the development of *O. porcinus* but the traditional open buildings typically used for pig rearing in these regions may not provide appropriate habitats for endophilous and photophobic soft ticks [28,30]. Conversely, under the harsh and apparently unfavourable climatic conditions of the Central Highlands in the Antananarivo zone, *O. porcinus* may survive and complete its development cycle in the traditional closed pig buildings encountered in this region, which maintain suitable darkness and humidity for soft ticks and buffer external climatic variations. Locally, the frequency of pig building disinfections using Cresyl (effective acaricide, in addition to its antibacterial, antiviral and antifungal properties), as mentioned by some farmers, may prevent tick establishment. Further investigations on probable recent climate changes in Madagascar and anthropogenic effects such as the increasing use of insecticides for controlling plague or malaria, or the improvement of hygiene in households should also be encouraged in order to identify other factors that might have promoted

consistent and permanent modifications in the distribution patterns of *O. porcinus* in Madagascar.

Conclusions

Our examinations of Malagasy pig farms confirmed the presence of a soft tick belonging to the *O. porcinus domesticus* sub-species Walton, 1962 on the island, at least at one site, and its natural long-term infection by ASFV. The role of this argasid tick in virus maintenance and probably transmission in endemic areas seems to be relevant. However, for unknown reasons, its distribution range in Madagascar seems to have considerably declined over these last decades. Only small scattered infested foci may remain, which might moderate the role of this soft tick in the observed persistence of ASFV in Malagasy domestic pigs since its introduction more than ten years ago.

Acknowledgements

I would like to thank the following people: Solenne Costard (Royal Veterinary College, London) for her assistance in defining sampling protocols and organising field investigations on pigs in Madagascar; Céline Humbert, Stéphanie Franco and Harentsoaniana Rasamoelina Andriamanivo (MSc students at the CIRAD, Montpellier) for collecting pig sera in Madagascar; Adrien Bretaudeau (MSc student at the CIRAD, Montpellier) for collecting data on facilities and pig treatments in the village of Anivonimamo in Madagascar; Frédéric Stachurski (ORAD, Antananarivo) for collecting ticks in the field; Camille Danes (CIRAD, Montpellier) for editing the maps of Madagascar and specific study zones; Dr Ricardo Perez-Sanchez (University of Salamanca, Spain) for testing pig sera using the anti-*O. moubata* ELISA test, as a preliminary approach, and Gail Wagman for editing the English manuscript. This work was supported by the Wellcome Trust (NP210183, 183, AH/DW/03/04) (<http://www.wellcome.ac.uk/index.htm>).

Author details

¹National Centre of Applicable Research for Rural Development (FORFA/DRZV), BP 4, Antananarivo, Madagascar. ²Centre of International Cooperation in Agricultural Research for Development (CIRAD), CMAEE Unit, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France. ³CIRAD, AGIRs Unit, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France. ⁴Science Faculty, Antananarivo University, BP 566, Antananarivo, Madagascar.

Authors' contributions

JR performed field tick collections and laboratory analyses on tick and pig samples. She wrote part of the methods VM and EA supervised laboratory analyses. FJ, AA and FR assisted with field investigations and data analyses. LV designed the sampling protocol, supervised field investigations, analysed data and wrote the remaining sections of the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 21 July 2010 Accepted: 30 November 2010
Published: 30 November 2010

References

1. Arias M, Sanchez-Vizcaino JM: African Swine Fever. In *Trends in emerging viral infections of swine*. Edited by: Morilla A, Yoon KJ, Zimmerman JJ. Ames: Iowa State University Press; 2000:119-124.
2. Costard S, Wieland B, de Glanville William, Jori F, Rowlands R, Vosloo W, Roger F, Pfeffer DU, Dixon LK: African swine fever: how can global spread be prevented? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009, **364**:2683-2696.
3. Rowlands RJ, Michaud V, Heath L, Hutchings G, Oura C, Vosloo W, Dwarka R, Onashvili T, Albina E, Dixon LK: African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerg Infect Dis* 2008, **14**:1870-1874.
4. Plowright W, Parker J, Pierce MA: African Swine Fever Virus in ticks (*Ornithodoros moubata*, Murray) collected from animal burrows in Tanzania. *Nature* 1969, **221**:1071-1073.
5. Haresnape JM, Wilkinson PJ: A study of African swine fever virus infected ticks (*Ornithodoros moubata*) collected from three villages in the ASF enzootic area of Malawi following an outbreak of the disease in domestic pigs. *Epidemiol Infect* 1989, **102**:507-522.
6. Oleaga-Pérez A, Pérez-Sánchez R, Encinas-Grandes A: Distribution and biology of *Ornithodoros erraticus* in parts of Spain affected by African swine fever. *Vet Rec* 1990, **13**:32-37.
7. Plowright W, Perry CT, Pierce MA, Parker J: Experimental infection of the argasid tick, *Ornithodoros moubata porcinus*, with African swine fever virus. *Arch Gesamte Virusforsch* 1970, **31**:33-50.
8. Plowright W, Perry CT, Pierce MA: Transovarial infection with African swine fever virus in the argasid tick, *Ornithodoros moubata porcinus*, Walton. *Res Vet Sci* 1970, **11**:582-584.
9. Plowright W, Perry CT, Greig A: Sexual transmission of African swine fever virus in the tick, *Ornithodoros moubata porcinus*, Walton. *Res Vet Sci* 1974, **17**:106-113.
10. Basto AP, Nix RJ, Boiras F, Mendes S, Silva MJ, Cartaxo C, Portugal RS, Letão A, Dixon LK, Martins C: Kinetics of African swine fever virus infection in *Ornithodoros erraticus* ticks. *J Gen Virol* 2006, **87**:1863-1871.
11. Walton GA: The *Ornithodoros moubata* subspecies problem in relation to human relapsing fever epidemiology. *Symp Zool Soc Lond* 1962, **6**:83-156.
12. Val L, Wieland B, Jori F, Etter E, Dixon L, Roger F: African Swine Fever virus DNA in soft ticks, Senegal. *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:1928-1931.
13. Goroguc M, Roger F, Bastos A, Butler C, Randriamparany T, Smolnick S, Cruciere C: Isolation of a non-haemadsorbing, non-cytopathic strain of African swine fever virus in Madagascar. *Epidemiol Infect* 2001, **126**:453-459.
14. Rousset D, Randriamparany T, Maharavo Rahantamalala CY, Randriamafela N, Zeller H, Rakoto-Andrianarivo M, Roger F: Introduction de la peste porcine africaine à Madagascar, histoire et leçons d'une émergence. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 2001, **67**:31-33.
15. Andrianjainelovo V: *Artiodactyla Potamochoerus larvatus*, Bush Pig, *Lambo, Lambada, Lambola, Antsanga*. In *The Natural History of Madagascar*. Edited by: Goodman S, Benstead J. Chicago: The University of Chicago Press; 2003:1365-1367.
16. Lamoureux A: Présence d'*Ornithodoros moubata* dans un foyer de fièvre récurrente à la côte ouest de Madagascar. *Bull Soc Path Exot* 1913, **6**:146-149.
17. Sulley BW: La fièvre récurrente malgache. Origine. Mode de propagation. Extension. *Bull Soc Path Exot* 1916, **9**:688-693.
18. Poisson H: Les maladies parasitaires à Madagascar. *Rev Sci Illust* 1931, **69**:230-237.
19. Le Gall R: Vue d'ensemble sur les maladies pestilentielles, endémo-épidémiques, transmissibles et sociales à Madagascar entre 1936 et 1940. *Bull Off Int Hyg Publ* 1943, **35**:417-450.
20. Néel R, Payet M, Gonnin C: La fièvre récurrente à tiques de Madagascar. Historique, Etat actuel de la question. *Bull Soc Path Exot* 1949, **42**:384-394.
21. Colas-Belcour J, Néel R: Contribution à l'étude de la transmission du spirochète de la fièvre récurrente malgache (*Borrelia duttoni*) par des *Ornithodoros moubata* de même origine. *Bull Soc Path Exot* 1952, **45**:69-78.
22. Walton GA: The *Ornithodoros moubata* subspecies problem in relation to human relapsing fever epidemiology. *Symp Zool Soc Lond* 1962, **6**:83-156.
23. Uilenberg G: Existence de *Ornithodoros porcinus* Walton, 1962 (Argasidae) à Madagascar. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* 1963, **16**:147-150.
24. Roger F, Ratovonjato J, Vola P, Uilenberg G: *Ornithodoros porcinus* ticks, bushpigs, and African swine fever in Madagascar. *Exp Appl Acarol* 2001, **25**:263-269.
25. Canals A, Oleaga A, Pérez R, Dominguez J, Encinas A, Sánchez-Vizcaino JM: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific antibodies in pigs infested with the tick *Ornithodoros erraticus* (Argasidae). *Vet Parasitol* 1990, **37**:145-153.
26. Baranda JA, Pérez-Sánchez R, Oleaga-Pérez A, Encinas-Grandes A: Antigens of interest for the diagnosis of parasitism in pigs by *Ornithodoros erraticus* and *Ornithodoros moubata*. *J Parasitol* 1997, **83**:831-838.

27. Rodhain F, Fontenille D: La récurrente à tiques malgache, une affection éradiquée? *Bull Soc Path Exot* 1989, **82**:192-198.
28. Moxel PC: Les tiques d'Afrique et du Bassin Méditerranéen [CDROM]. Montpellier: CIRAD Editions; 2003.
29. Butler JF, Holscher KH, Adeyeye O, Gibbs EPJ: Sampling techniques for burrow dwelling ticks in reference to potential African swine fever virus vectors. In *Acarology M. Volume 2*. Edited by: Griffiths DA, Bowman CE. Chichester: Ellis Horwood; 1984:1065-1074.
30. Vial L: Biological and ecological characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. *Parasite* 2009, **16**:191-202.
31. Halos L, Jamal T, Vial L, Maillard R, Suau A, Le Menach A, Boulouis HJ, Vayssier-Tausat M: Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Vet Res* 2004, **5**:1-18.
32. Vial L, Durand P, Arnathau C, Halos L, Diatta G, Trape JF, Renaud F: Molecular divergences of the *Ornithodoros sonrai* soft tick species, a vector of human relapsing fever in West Africa. *Microbes Infect* 2006, **8**:2605-2611.
33. Basto AP, Portugal RS, Nix RJ, Cartaxo C, Boinas F, Dixon LJ, Leitão A, Martins C: Development of a nested PCR and its internal control for the detection of African swine fever virus (ASFV) *Ornithodoros erraticus*. *Arch Virol* 2006, **151**:819-826.
34. Galtier N, Gouy M, Gautier C: SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 1996, **12**:543-548.
35. Felsenstein J: Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985, **39**:783-791.
36. Black WC, Piesman J: Phylogeny of hard-and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16 S rDNA sequences. *Evolution* 1994, **91**:10034-10038.
37. Fukunaga M, Ushijima Y, Aoki Y, Talbert A: Detection of *Borrelia duttoni*, a tick-borne relapsing fever agent in Central Tanzania, within ticks by flagellin gene-based nested polymerase chain reaction. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2001, **1**:331-338.
38. Oleaga-Pérez A, Pérez-Sánchez R, Astigarraga A, Encinas-Grandes A: Detection of pig farms with *Ornithodoros erraticus* by serology. Elimination of non-specific reactions by carbohydrate epitopes of salivary antigens. *Vet Parasitol* 1994, **52**:97-111.

doi:10.1186/1756-3305-3-115

Cite this article as: Ravaomanana et al: First detection of African Swine Fever Virus in *Ornithodoros porcinus* in Madagascar and new insights into tick distribution and taxonomy. *Parasites & Vectors* 2010 **3**:115.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ORIGINAL ARTICLE

Assessment of interactions between African swine fever virus, bushpigs (*Potamochoerus larvatus*), *Ornithodoros* ticks and domestic pigs in north-western Madagascar

J. Ravaomanana¹, F. Jori^{2,3}, L. Vial³, R. Pérez-Sánchez⁴, E. Blanco⁵, V. Michaud³ and F. Roger²

¹ FORIFA, Malagasy Centre for Research in Agronomy, Antananarivo, Madagascar

² CIRAD, AGIRs Unit, Montpellier, France

³ Mammal Research Institute, Department of Zoology, University of Pretoria, South Africa

⁴ UMR 15 ,CIRAD-INRA, CIRAD BIOS, Montpellier, France

⁵ Parasitology Laboratory, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, IRNASA/CSIC, Salamanca, Spain

⁶ CISA-INIA, Valdeolmos, Madrid, Spain

Keywords:

African swine fever; ecology; *Potamochoerus larvatus*; *Ornithodoros moubata* complex; Madagascar

Correspondence:

Ferran Jori. UPR AGIRs, CIRAD ES, Mammal Research Institute, Department of Zoology and Entomology, University of Pretoria, 0002 South Africa. Tel.: 012 420 20 16; Fax: 012 420 25 34; E-mail: ferran.jori@cirad.fr

Received for publication October 6, 2010

doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01207.x

Summary

Since its introduction in Madagascar in 1998, African swine fever (ASF) has severely affected national pig production and persists as a common disease in that country. Two of its natural hosts in the African continent, the bushpig (*Potamochoerus larvatus*) and tick vectors of the *Ornithodoros moubata* complex, are reported in west and central regions of the island. However, their role in the maintenance and transmission of the virus has been insufficiently studied. In this work, we tried to assess their potential role in the epidemiology of the disease in Madagascar, by assessing the levels of interaction between (i) ASF virus (ASFV) and bushpigs and (ii) between soft ticks and domestic and wild suids in north-western Madagascar. Twenty-seven sera and 35 tissue samples from bushpigs were collected and analysed for the presence of anti-ASFV antibodies and viral DNA. In addition, the sera from 27 bushpigs and 126 domestic pigs were analysed with an ELISA test for the detection of antibodies against salivary antigens from *Ornithodoros* ticks. No circulation of ASFV or anti-ASFV antibodies nor anti-tick antibodies were detected in bushpigs. However, seven of the domestic pig sera (5.6% of the total sample population) were antibody positive for *O. moubata* antigens. The probability of freedom from ASFV in the bushpig population using Bayesian statistical methods ranged between 73% and 84%. The probabilities of absence of anti-tick antibodies in domestic and wild pigs were estimated at 63% and 71%, respectively. These preliminary results suggest that bushpigs are unlikely to play a significant role in the maintenance and transmission of ASFV in Madagascar. Nevertheless, further ASFV surveys are needed on that species to confirm this assumption. In addition, the presence of antibodies against *O. moubata* in domestic pigs suggests that soft ticks may be able to maintain ASFV within a domestic pig cycle in areas of Madagascar where they remain present.

Introduction

African swine fever (ASF), caused by a DNA virus of the Family *Asfarviridae*, is one of the most serious diseases of domestic pigs in sub-Saharan African countries and is still threatening the pig population and the rural economy of

other continents (Arias et al., 2002; Costard et al., 2009c). The virus is extremely contagious, and the lack of an efficient vaccine, together with the involvement of wild hosts able to maintain the virus in the environment, is considered the major constraint for control of the disease (Penrith et al., 2004; Rahimi et al., 2010). African swine

fever has moved out of the African continent on a number of occasions (Costard et al., 2009c), being introduced in the Iberian Peninsula (Arias et al., 2002), Latin America, the Indian Ocean (Roger et al., 2001; Lubisi et al., 2009) and more recently spreading from the Caucasus region and Russia into Central Asia (Rowlands et al., 2009; Rahimi et al., 2010). In Europe, the disease has been maintained in the Island of Sardinia for many years through direct contact between domestic pigs and wild boars.

Wild suids – warthogs (*Phacochoerus* spp.) and bushpigs (*Potamochoerus* spp.) – and soft ticks of the genus *Ornithodoros* spp. are considered the most common natural hosts in the natural cycle of the disease described in Africa (Plowright et al., 1981). The specific relation between warthogs and soft ticks is extremely well described in the literature for eastern and southern Africa (Plowright et al., 1981; Thomson, 1985). Although there are some exceptions, high ASFV infection rates occur in most warthog populations examined in East and southern Africa reaching seroprevalences of 80% or higher. They get infected early in life, when bitten by *O. moubata* complex ticks living in the warthog burrows. Virus replicates in young warthogs causing viraemia which is sufficient to infect a proportion of ticks in the burrow and maintain the cycle. However, in other regions such as West Africa, important gaps of knowledge remain on the possible role of warthogs and soft ticks in the maintenance and transmission of the virus (Vial et al., 2007; Jori and Bastos, 2009).

As opposed to warthogs, the role played by bushpigs in the transmission of ASF is very poorly covered in the literature. Their susceptibility to ASFV was first recorded in 1921 (Montgomery, 1921) and in the 1960s. ASFV was isolated from several animals in East Africa (De Tray, 1963; Plowright et al., 1994). It is known that both species of *Potamochoerus*, the red river hog (*P. porcus*) and the bushpig (*P. larvatus*), can become infected with ASFV (Plowright et al., 1981; Luther et al., 2007) and become viraemic for several days without showing symptoms (Anderson et al., 1998). However, veterinary surveys of wild populations of *Potamochoerus* spp. are very scarce, and most reports document presence of the virus in lymphatic tissues. In fact, serological evidence of the virus in this species has not been demonstrated.

The presence of soft ticks from the *O. moubata* complex was reported on the western coast of Madagascar since the 18th century and confirmed by several authors in the first half of the 20th century (Le Gall, 1943). More recent investigations suggested their possible extinction from the northern part of the Island since the 1950s (Rodhain and Fontenille, 1989), but records of their presence remain in central parts of the country (Roger et al., 2001) and some evidence has been found recently of *O. porcinus* ticks being infected with ASFV (Ravaomanana et al., 2010).

One of the possible hypotheses explaining the persistence and endemicity of ASF in the Island is the potential role of wild hosts maintaining the virus in the environment. Despite the presence of *O. moubata* complex ticks and bushpigs in Madagascar, limited investigations have been undertaken to understand their contribution in the epidemiology of ASF and the interactions between these natural hosts and domestic pigs. The objective of this study was to fill that gap by (i) assessing the interactions between ASFV and bushpigs through the detection of ASFV antibodies and ASFV DNA in a sample of the bushpig population from the north-western region of Madagascar and by (ii) assessing the potential contacts between the argasid ticks and domestic and wild pigs through the detection of serum antibodies against *O. moubata* salivary antigens in the same sample of bushpigs ($n = 27$) and in a sample of domestic pigs ($n = 126$) taken from 67 farms and local abattoirs.

The results of those analyses were used to calculate the probability of freedom from disease in bushpigs and the probability of absence of contact between domestic and wild pigs and soft ticks using Bayesian statistical methods.

Materials and Methods

Study site

The study was carried out in Marovoay, a small riverine harbour of 65 000 inhabitants, localized in north-western Madagascar, approximately 600 km from Antananarivo and 115 km from Mahajanga, the capital city in this region. The majority of the population (60%) consists of agricultural farmers, while an additional 24% live from raising livestock. Traditional pig farming with local breeds is widespread in the region (Costard et al., 2009a). While in urban areas of Marovoay, 80% of pig farmers reported that their animals remain confined in pigsties all year long, in areas distant from the urban centre, free-ranging pigs are common and contacts between bushpigs and domestic pigs are often reported by farmers (C. Humbert, unpublished observations). This area has experienced several suspected outbreaks of ASF since the year 2000 and has had a number of laboratory confirmations based on ASFV isolation between 2002 and 2008 (V. Michaud, unpublished observations). Therefore, some of the potential agents for the development of a potential natural cycle of ASFV, such as the one described in the African continent, exist in this area of Madagascar, which is characterized by a hot and rainy climate. Average rainfall varies from 1000 with 1500 mm per year, and the normal temperature varies from 17 to 35°C. The predominant natural vegetation is encompassed by 4680 km² of dry semi-deciduous forest and bush savannah. Bushpigs (*P. larvatus*) in Madagascar are widespread in most forested areas of the island (Roger et al., 2001;

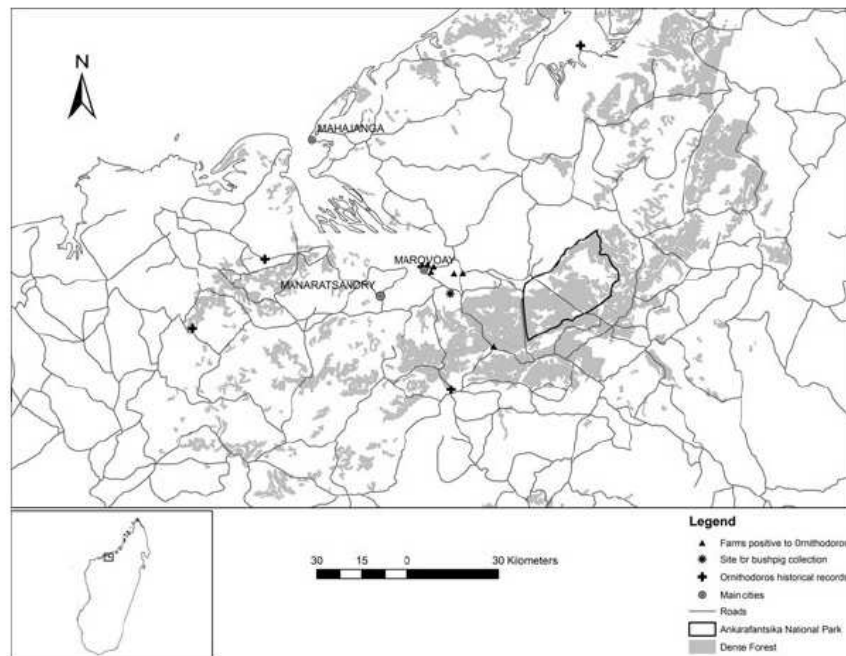


Fig. 1. Study site in Marovoay detailing the sampling site for bushpigs as well as historical soft tick collection points and location of farms with pigs positive to *O. moubata* antibodies.

Andrianjakarivelo et al., 2003). The Ankarafantsika National Park (ANP), which is only at 30 km from Marovoay, encompasses a wide surface (1300 km²) of dry dense deciduous forest (see Fig. 1). This forest provides cover to an abundant population of bushpigs that are often hunted by forest gatherers (Garcia and Goodman, 2003) who trade with their meat in the markets of neighbouring towns. Bushpig meat is widely consumed and commercially traded in coastal regions of Madagascar, including the north-western coast (Andrianjakarivelo et al., 2003).

Bushpig sampling design

To plan sample collection, we calculated sample size and probabilities of the detection of ASFV in the available bushpig population with the use of Win Episcope 2.0 (Thrusfield et al., 2001). Very few data are available on bushpig population densities in Africa with no data at all for Madagascar. To estimate the total population of bushpigs in our study area, we hypothesized that densities could be similar to those described in the closest geographical areas of subtropical forest available in the literature. Therefore, we based our calculation on data from the east coast of South Africa, where bushpig ecology is well described. Therefore, we hypothesized that density in

north-western Madagascar would also range from 0.35 to 0.5 individuals per km² (Seydack, 1990). We further postulated that the total population of bushpigs in the forest study area (4680 km²) would be higher than 1500 individuals. Despite bushpigs being recognized as a potential reservoirs for ASFV, there are no data available on the prevalence of ASFV in this species. The only estimate in the literature suggests that the prevalence of ASFV in bushpig populations is probably 10 times lower than in warthogs.

As prevalence figures of ASFV in warthogs in southern and East Africa are usually described as being close to 90% (Plowright et al., 1981), we used a value of 8% as a plausible minimum prevalence in bushpigs. Considering this expected value, we calculated that a sample size of 35 animals would be sufficient to detect at least one infected animal in the estimated population with a 95% confidence interval, considering that the diagnostic tests were hypothetically perfect (100% sensitive and specific).

Sampling strategy and collection

Bushpig samples

With the collaboration of traditional hunters, 35 bushpigs were captured alive with traditional traps in the forested

areas around Marovoay between June and September 2006 (see Fig. 1). While the animals were slaughtered to be traded in the local market, blood and tissue samples were collected.

Blood samples were kept at +4°C during transport. Once in the laboratory, blood was centrifuged, the clot was removed and serum was stored at -70°C.

A 5-cm piece of spleen tissue was collected from every animal during carcass dressing off and placed in PBS with 100 µg/ml of penicillin and streptomycin solution. Samples were stored at +4°C until they could be stored in the laboratory at -80°C to retain virus infectivity. A total of 35 tissue samples and 27 bushpig serum samples were then sent to reference laboratories in Europe to be tested for the presence of ASFV in tissues (CIRAD Virology Laboratory, Montpellier, France) and ASF antibodies in sera (CISA-INIA, Madrid, Spain), respectively.

Domestic pig samples

A batch of 126 domestic pig sera from the Marovoay area was chosen randomly from a larger sample of domestic pigs collected in a previous national prevalence study (Costard et al., 2009b). This sample represented a total of 38 animals collected at the local abattoir and 88 animals collected from 67 farms.

Sample analysis

Serological screening of bushpig serum samples

Different serological methods were used for the detection of antibodies against ASFV: The commercial kit p72 Blocking ELISA test (Ingezim PPA Compac 1.1.PPA K3 Elisa kit; Ingensasa, Madrid, Spain), described in the OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (OIE, 2008), was combined with other laboratory-made tests such as the Algenex rp30 ELISA and immunoblotting (Perez-Filgueira et al., 2006).

ASFV DNA detection in bushpig tissue samples

Spleen tissue samples were analysed for the presence of virus with conventional PCR (Polymerase Chain Reaction), a method internationally accepted for the detection of ASFV in the OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (OIE, 2008).

Two grams of spleen tissue was homogenized in 2 ml Eagle minimum essential medium (EMEM) containing 50 U/ml of penicillin, streptomycin and amphotericin B. The homogenate was then centrifuged, and the supernatant was recovered and preserved at -80°C. DNA (200 µl) was extracted and purified with a GFX Genomic Blood DNA purification kit (Amersham Biosciences) and preserved at -20°C.

One hundred nanograms of this DNA solution was used to amplify a DNA fragment of the B646L specific for the conserved regions of the VP72, following the protocol described by (Bastos et al., 2003).

Antibodies against tick saliva in bushpigs and domestic pigs' serum samples

Bushpig and domestic pig sera were tested for antibodies against *O. moubata* salivary antigens using an ELISA test developed in Spain for detecting *Ornithodoros* spp. in domestic pigs (Oleaga-Perez et al., 1994; Baranda et al., 1997).

Statistical analysis

Instead of classical frequentist statistics, we used Bayesian statistical methods which require starting with prior probability distributions which represent a robust procedure for incorporating information from previous studies: in our case prior values of prevalence, test specificity and sensitivity values. Posterior probabilities obtained after combining priors and observed data through Bayesian modelling can be used as easily interpretable alternatives to *P* values. The Bayesian approaches are well adapted to determine whether the prevalence or seroprevalence of an infectious disease in a sampled population exceeds a given cut-off value with small sample sizes (Branscum et al., 2006). If the estimated prevalence is below this cut-off value, the population could be considered as 'disease free'. Prior values of sensitivity and specificity were provided by experts who developed these tests and are experienced in their routine laboratory application, and were also obtained from available literature.

An additional assumption made was that the laboratory tests used in our study were designed and assessed for domestic pigs, and they were unlikely to perform accurately in bushpig samples. Thus, prior distributions reflecting this uncertainty about the performances (sensitivity and specificity) of the diagnostic tests used were incorporated into the Bayesian computation. We used binomial sampling to adjust for the fact that sample size was small compared to the total population (n/N is <0.1).

BetaBuster software, available at the UC Davis Diagnostic test web site <http://www.epi.ucdavis.edu/diagnostictests/betabuster.html>, allowed us to obtain probability distributions based on prior best guess values for sensitivity, specificity and prevalence. Distributions for the prevalence of ASFV DNA and ASF antibodies and anti-tick antibodies were considered to be uniform as we did not have any prior information about prevalence. The bushpig humoral response to tick bites from the *O. moubata* complex was considered to be the same than in domestic pigs – lasting for 4 months – (Baranda et al., 1997), although the level of uncertainty in this assumption was high.

The computation of posterior probability for disease freedom was performed by the software program Bayes-freecalcl (Johnson et al., 2004), available at the UC Davis web site (<http://www.epi.ucdavis.edu/diagnostictests/betabuster.html>).

The parameterization of the programme used a maximum population of 2000 individuals, a Monte Carlo size for binomial case of 20 000 and a burn-in size for binomial case of 5000.

We determined the posterior probability that a population of a given size with a given number of positive reactors (test positive individuals) out of a sample of size n truly exceeded some predetermined cut-off value. This cut-off value was established at 5% as a realistic compromise for assessing the level of freedom.

Results

Laboratory analysis

All samples from bushpigs (sera and spleen tissues) were found negative for both antibodies ($n = 27$) and virus ($n = 35$). The 27 bushpig sera were also found negative for antibodies against *O. moubata* salivary antigens. Seven of 126 serum samples from domestic pigs (5.6% of the sample), originating from seven different farms, showed a positive result for anti-tick antibodies.

Probability of freedom of disease or absence of interactions

Table 1 shows that the posterior probability for the sampled bushpig population being free of ASFV was estimated at 85%. The probability for the same population of bushpigs being free of ASFV antibodies ranged between 73% and 75% depending on the diagnostic test used. The probability of the sampled animals being free of anti-tick antibodies (considering a prevalence cut-off at 5%) was estimated to be 71% for bushpigs and at 61% for domestic pigs.

Discussion

Excluding the giant forest hog (*Hylochoerus meinertzhageni*), for which contacts with domestic pigs are rare, the bushpig is probably the least studied from all the potential wild reservoirs of ASFV in Africa (Jori and Bastos, 2009). The absence of available data on its disease burden or ecology is unfortunate because they are often reported to interact with domestic pigs in many areas of their distribution range (Haresnape et al., 1985; Vercammen et al., 1993; Jori and Bastos, 2009) and are likely to share many common pathogens.

Except for the isolation of ASFV from several animals in East Africa (De Tray, 1963), the few recent studies on

Table 1. Estimated probability that bushpigs are free of ASFV DNA, ASF antibodies and anti-tick antibodies given different prevalence cut-offs. The prior prevalence is Beta (1, 1)

| TESTS | Performances/confidence | Confidence % | Se mode (%) | Se percentile (%) | Beta distribution (a,b) for Se | Sp mode (%) | Sp percentile (%) | Beta distribution (a,b) for Sp | Total number of samples | Number Positive samples | P freedom (cut-off 5%) | | |
|--------------------------------------|------------------------------|--------------|-------------|-------------------|--------------------------------|-------------|-------------------|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|---|------|
| Bushpig | | | | | | | | | | | | | |
| ASFV PCR | High/high | 95 | 99 | 95 | 88.280 | 1.882 | 99 | 95 | 88.280 | 1.882 | 35 | 0 | 0.84 |
| bELISA ASF Ab (INGENASA) | Moderate/moderate | 80 | 95 | 90 | 40.578 | 3.083 | 95 | 90 | 40.578 | 3.083 | 27 | 0 | 0.73 |
| p30 ELISA ASF Ab | Moderate/moderate | 80 | 95 | 90 | 40.578 | 3.083 | 95 | 90 | 40.578 | 3.083 | 27 | 0 | 0.73 |
| Western Blot ASF Ab | High/high | 95 | 99 | 95 | 88.280 | 1.882 | 99 | 95 | 88.280 | 1.882 | 27 | 0 | 0.75 |
| ELISA <i>Ornithodoros moubata</i> Ab | Moderate (Se) – low (Sp)/low | 50 | 90 | 80 | 4.727 | 1.414 | 80 | 70 | 3.212 | 1.553 | 27 | 0 | 0.71 |
| Domestic pig | | | | | | | | | | | | | |
| ELISA <i>O. moubata</i> Ab | Moderate (Se) – low (Sp)/low | 50 | 90 | 80 | 4.727 | 1.414 | 80 | 70 | 3.212 | 1.553 | 118 | 7 | 0.63 |

ASF, African swine fever; ASFV, ASF virus; Ab, Antibodies; Se, Sensitivity; Sp, Specificity.

ASF prevalence in natural populations of *Potamochoerus* spp. are restricted to a single report of serological screening in 10 individuals sampled in Zimbabwe (Anderson et al., 1998) and another report of 11 individuals sampled (sera and spleen tissue) in Malawi (Haresnape et al., 1985). All the animals were negative.

Despite the small sample size in our study, it appears to be the largest survey on ASFV in wild bushpigs reported to date. Our bushpig samples tested negative for the presence of antibodies with both ELISA and immunoblotting assays, and no virus was detected in spleen tissue by PCR, suggesting the absence of previous exposure and lack of current circulation of ASFV in the sampled population. The small sample size and the possibility that currently available diagnostic tests are not highly effective in this wild suid lead us to use of a Bayesian framework to quantify the uncertainty and the probability of freedom at the population scale. The results suggest that the probability of freedom of ASFV in the studied bushpig population ranges between 73% and 85%, depending on the test used, and at the chosen cut-off of 5% (Table 1). Anderson et al. (1998) reported that bushpigs were not able to become easily infected by horizontal transmission, when exposed to viraemic domestic pigs or bushpigs. However, bushpigs could become infected through occasional ingestion of infected domestic pigs or parts of their carcasses. This seems a plausible event in Marovoay where bushpigs and pigs are reported to share the same areas. Since 1998, several outbreaks of ASF in domestic pig farms have been suspected by farmers, and on at least in two occasions, the disease was confirmed by viral isolation, in 2002 and in 2008. Under these circumstances of recurrent viral circulation, common presence of bushpigs and possible contacts between bushpigs and free-ranging pigs, the likelihood of the bushpig population becoming infected with ASFV in our study area can be considered to be important.

Our results suggest that future attempts to detect ASFV in bushpigs in Madagascar – and this is also applicable for Africa – should be based on a larger sample size and on monitoring or surveillance systems (MOSS). Sampling should ideally consider different collection areas used by hunters and particularly those where possible contacts between free-ranging pigs and bushpigs could occur to maximize the probability of detection. Consequently, MOSS should be built up on risk assessment, structured as targeted repeated surveys or sentinel surveillance in the at-risk areas, and if at all possible, based on laboratory tests validated for the targeted species. Working with bushpigs in Africa is generally difficult because of their elusive nature and nocturnal habits (Haresnape et al., 1985). However, in Madagascar, those constraints can be addressed by collaborating with local stakeholders

involved in the bushpig meat network (hunters, middlemen and market butchers), making the implementation of surveys at a larger scale easier than in other countries.

Despite the presence of ticks from the *O. moubata* complex being reported in the Marovoay region, there was no evidence of interactions between those and bushpigs. This supports the hypothesis that unlike warthogs, bushpigs do not live in suitable habitats allowing the settlement of endophilous *O. moubata* complex ticks (Roger et al., 2001). Indeed, bushpigs' nests consist of temporary wet piles of grass in areas of dense vegetation (Vercammen et al., 1993) which are unsuitable for *O. moubata* complex ticks (Penrith et al., 2004).

A few domestic pig samples were positive for anti-tick antibodies (7/126), according to the crude ELISA cut-off defined. However, no soft ticks' specimens were found in this area despite several in-depth field investigations in pig farms in Marovoay (Ravaomanana et al., 2010). Considering that the specificity of the test is close to 90% (Perez-Sanchez, R., unpublished observations), those positive samples could fall within the range of false-positive animals. Other alternative possibilities to explain those results are (i) that some of these samples are truly positive and that some domestic pigs have been bitten by soft tick less than 4 months ago, in our study area or (ii) that animals were bitten in other regions of the country, where *O. moubata* is still present, and were moved into Marovoay within the last 4 months. Indeed, recent findings have provided evidence of the existence ASFV-infected *O. porcinus* ticks in the Central Highlands of Madagascar (Ravaomanana et al., 2010); however, recent movement of pigs could not be conveniently investigated.

In this study, we used Bayesian statistics to estimate freedom of disease or absence of interactions between hosts. The advantages of using Bayesian framework are that (i) it can be used for small samples (Branscum et al., 2006), (ii) it allows great flexibility in managing statistical models both conceptually and computationally, (iii) it allows for the combination of field data and available scientific information, including uncertainty and variability, in a coherent approach and (iv) it allows direct probability understanding of outcome results, and therefore, practical and statistical significance can be readily evaluated by scientists and policymakers (University of California, 2006; Dohoo et al., 2009).

Conclusions

Our results suggest that prevalence of ASF virus in the sampled population of Madagascan bushpigs is low with a sporadic pattern or non-existent, supporting the hypothesis that bushpigs play an insignificant role in the maintenance and dissemination of ASF in Madagascar.

However, further studies with larger samples and/or MOSS, joining together ecological investigations and epidemiological surveys, remain necessary to confirm these findings. Equally, experimental infections of captive bushpigs with ASFV, such as those developed in Zimbabwe at the end of 1990s (Anderson et al., 1998; Oura et al., 1998), should be replicated in Madagascar to elucidate the susceptibility of the Madagascar variety of *P. larvatus* to local ASF circulating viral strains.

No evidence of interactions between soft ticks and bushpigs could be found in our study. However, the occurrence of a limited number of positive domestic pigs to *O. moubata* complex antibodies raises the hypothesis that occasional contacts between domestic pigs and soft ticks are possible and that the arthropods could contribute to ASFV maintenance in the environment, in areas where the tick remains present.

Acknowledgements

The study was carried out from 2006 to 2008 within the framework of the research project 'Diagnosis, epidemiology and control of African swine fever virus' funded by the Wellcome Trust (N°210183. 183, AHDW/03/04). The work at CISA-INIA was supported by CYCIT (AGL07-66441-CO3-O2) and CSD (00C-06-02320). We also express our gratitude to the Veterinary Services of Madagascar, the *Maison du Petit Elevage* and Dr Abel Andriatsimahavandy from the University of Antananarivo for supporting this work. We also thank Prof. Antonio Encinas Grandes from the University of Salamanca for his availability and cooperation regarding the salivary gland ELISA test and Dr Armanda Bastos for reviewing the manuscript.

References

- Anderson, E. C., G. H. Hutchings, N. Mukarati, and P. J. Wilkinson, 1998: African swine fever virus infection of the bushpig (*Potamochoerus porcus*) and its significance in the epidemiology of the disease. *Vet. Microbiol.* 62, 1–15.
- Andrianjakarivelo, V., S. Goodman, and J. Benstead, 2003: Artiodactyla: *Potamochoerus larvatus*, Bush Pig, Lambo, Lambodia, Lamboala, Antsanga. In: Goodman, S., and J. Benstead (eds), *The Natural History of Madagascar*, pp. 1365–1367. The University of Chicago Press, Chicago.
- Arias, M. L., J. M. Sanchez-Vizcaino, A. Morilla, K. J. Yoon, and J. F. Zimmermann, 2002: African swine fever. In: Morilla, A., K. J. Yoon, and J. F. Zimmermann (eds), *Trends in Emerging Viral Infections of Swine*, pp. 119–139. Iowa State University Press, Ames.
- Baranda, J. A., R. Perez-Sanchez, A. Oleaga-Perez, and A. Encinas Grandes, 1997: Antigens of interest for the diagnosis of parasitism in pigs by *Ornithodoros erraticus* and *Ornithodoros moubata*. *J. Parasitol.* 83, 831–835.
- Bastos, A. D. S., M. L. Penrith, C. Crucière, J. L. Edr ch, G. H. Hutchings, F. Roger, E. Couacy-Hymann, and G. R. Thomson, 2003: Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch. Virol.* 148, 693–706.
- Branscum, A. J., W. O. Johnson, and I. A. Gardner, 2006: Sample calculations for disease freedom and prevalence estimation surveys. *Stat. Med.* 25, 2658–2674.
- Costard, S., V. Porphyre, S. Messad, S. Rakotondrahanta, H. Vidon, F. Roger, and D. U. Pfeiffer, 2009a: Multivariate analysis of management and biosecurity practices in small-holder pig farms in Madagascar. *Prev. Vet. Med.* 92, 199–209.
- Costard, S., T. Radriamparany, C. Humbert, S. Franco, H. Rasamoelina, S. Rakotondrahanta, E. Albina, F. Roger, and D. U. Pfeiffer, 2009b: Estimating the prevalence of African swine fever in Madagascar. 12th International Conference of Veterinary Epidemiology and Economics (ISVEE). Durban, South Africa.
- Costard, S., B. Wieland, W. F. Jori, R. Rowlands, W. Vosloo, F. Roger, D. U. Pfeiffer, and L. Dixon, 2009c: African swine fever: How can global spread be prevented? *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 364, 2683–2696.
- De Tray, D. E., 1963: African swine fever. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 19, 299–333.
- Dohoo, I., W. Martin, and H. Stryhn, 2009: *Veterinary Epidemiologic Research*, 2nd edn. University Of Prince Edward Island Press, Charlottetown.
- Garcia, G., and S. M. Goodman, 2003: Hunting of protected animals in the Parc National d'Ankarafantsika, north-western Madagascar. *Oryx* 37, 115–118.
- Haresnape, J. M., S. A. Lungu, and F. D. Mamu, 1985: A four year survey of African swine fever in Malawi. *J. Hyg. (Lond)* 95, 309–323.
- Johnson, W. O., C. L. Su, I. A. Gardner, and R. Christensen, 2004: Sample size calculations for surveys to substantiate freedom of populations from infectious agents. *Biometrics* 60, 165–171.
- Jori, F., and A. D. S. Bastos, 2009: Role of wild suids in the epidemiology of African swine fever. *EcoHealth*, 6, 296–310.
- Le Gall, R., 1943: Vue d'ensemble sur les maladies pestilentielles, end mo- pid miques, transmissibles et sociales a Madagascar entre 1936 et 1940. *Bull. Off. int. Hyg. publ.* 37, 417–450.
- Lubisi, B. A., R. M. Dwarka, D. Meenowa, and R. Jaumally, 2009: An investigation into the first outbreak of African swine fever in the Republic of Mauritius. *Transbound Emerg. Dis.* 56, 178–188.
- Luther, N. J., K. A. Majiyagbe, D. Shamaki, L. H. Lombin, J. F. Antiagbong, Y. Bitrus, and O. Owolodun, 2007: Detection of African swine fever virus genomic DNA in a Nigerian red river hog (*Potamochoerus porcus*). *Vet. Rec.* 160, 58–59.

- Montgomery, R. E., 1921: On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). *J. Comp. Pathol.* 34, 243–262.
- OIE, 2008: African Swine Fever. Available at: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.08.01_ASF.pdf. 2010).
- Oleaga-Perez, A., R. Perez-Sanchez, A. Astigarraga, and A. Encinas Grandes, 1994: Detection of pig farms with *Ornithodoros erraticus* by pig serology. Elimination of non-specific reactions by carbohydrate epitopes of salivary antigens. *Vet. Parasitol.* 52, 97–111.
- Oura, C. A., P. P. Powell, E. Anderson, and R. M. Parkhouse, 1998: The pathogenesis of African swine fever in the resistant bushpig. *J. Gen. Virol.* 79, 1439–1443.
- Penrith, M. L., G. R. Thomson, and A. D. S. Bastos, 2004: African swine fever. In: Coetzer, J. A. W., and R. C. Tustin (eds), *Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*, pp. 1088–1119. Oxford University Press, Cape Town.
- Perez-Figueira, D. M., F. Gonzalez-Camacho, C. Gallardo, P. Resino-Talavan, E. Blanco, E. Gomez-Casado, C. Alonso, and J. M. Escribano, 2006: Optimization and Validation of Recombinant Serological Tests for African Swine Fever Diagnosis Based on Detection of the p30 Protein Produced in *Trichoplusia ni* Larvae. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3114–3121.
- Plowright, W., 1981: African swine fever. In: Davis, J. W., L. H. Karstad, and D. O. Trainer (ed), *Infectious Diseases of Wild Mammals*, pp. 178–190. Iowa University Press, Iowa.
- Plowright, W., G. R. Thomson, and J. A. Naser, 1994: African swine fever. In: Coetzer, J. A. W., G. R. Thomson, and R. C. Tustin (eds), *Infectious Diseases of livestock with special reference to Southern Africa*, pp. 567–599. Oxford University Press, Cape Town.
- Rahimi, P., A. Sohrabi, J. Ashrafihelan, R. Edalat, M. Alamdari, and M. Masoudi, 2010: Emergence of African swine fever virus, northwestern Iran. Available at: <http://www.cdc.gov/EID/content/16/12/1946.htm> (accessed December 16, 2010).
- Ravaomanana, J., V. Michaud, F. Jori, A. Andriatsimahavandy, F. Roger, E. Albina, and L. Vial, 2010: First detection of African Swine Fever Virus in *Ornithodoros porcinus* in Madagascar and new insights into tick distribution and taxonomy. *Parasit. Vectors* 3, 115.
- Rodhain, F., and D. Fontenille, 1989: La fièvre récurrente à tiques malgache, une affection éradiquée? *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 82, 192–198.
- Roger, F., J. Ratovonjato, P. Vola, and G. Uilenber, 2001: *Ornithodoros porcinus* ticks, bushpigs, and African swine fever in Madagascar. *Exp. Appl. Acarol.* 25, 263–269.
- Rowlands, R. J., V. Michaud, L. Heath, G. H. Hutchings, C. A. Oura, W. Vosloo, R. Dwarka, T. Onashivili, E. Albina, and L. Dixon, 2009: African Swine Fever Virus Isolate, Georgia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1870–1874.
- Seydack, A.H.W., 1990: The ecology of the bushpig (*Potamochoerus porcus* Linn. 1758) in the Cape Province. South Africa. PhD Dissertation, University of Stellenbosch, Stellenbosch, South Africa, 728 pp.
- Thomson, G. R., 1985: The epidemiology of African swine fever: the role of free living hosts in Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 52, 201–209.
- Thrusfield, M., C. Ortega, I. de Blas, J. P. Noordhuizen, and K. Frankena, 2001: Win Episcope 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet. Rec.* 148, 567–572.
- University of California, Davis, 2006: BEST-Bayesian Epidemiologic Screening Techniques. Software Modules. BetaBuster. Available at: <http://www.epi.ucdavis.edu/diagnostictests/betabuster.html> (accessed 30 January 2011).
- Vercammen, P., A. H. W. Seydack, and W. L. B. Oliver, 1993: Chapter 4.4.: The Bush Pigs (*Potamochoerus porcus* and *P. larvatus*). In: Oliver, W. L. B. (ed.), *Pigs, Peccaries and Hippos Status Survey and Action Plan*, pp. 93–101. IUCN/SSC, Gland, Switzerland.
- Vial, L., B. Wieland, F. Jori, E. Etter, L. Dixon, and F. Roger, 2007: African swine fever virus DNA in soft ticks, Senegal. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1928–1931.

ANNEXES 2

Conférence et atelier internationaux relatifs à la thèse

Proceedings of the 12th International conference of the
Association of Institutions of Tropical Veterinary Medicine
Montpellier, 2007

THE ROLE OF WILD HOSTS (WILD PIGS AND TICKS) IN THE EPIDEMIOLOGY OF AFRICAN SWINE FEVER IN WEST AFRICA AND MADAGASCAR

JORI F.¹, VIAL L.¹, RAVAOMANANA J.³, LE GLAUNEC G.^{1,3}, ETTER E.¹,
AKAKPO J.², SARR J.⁵, COSTARD S.⁶, PEREZ R.⁴, ROGER F.¹

1.Cirad, Epidemiology and Ecology of Animal Diseases Research Unit
Campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

2.IESMV Inter-States School of Sciences and Veterinary Medicine,
Dakar, Senegal ,

3.FOFIFA, National Malagasy Center for Research in Agronomy,

4.Instituto de Recursos Naturales y Agrobiologia, Salamanca, Spain

5.ISRA (Institut Sénégalais de Recherche Agronomique), Dakar, Sénégal,

6.Royal Veterinary College, London, United Kingdom

ABSTRACT

African swine fever (ASF) adversely affects pig production in Sub-Saharan Africa. In southern and eastern Africa, the virus is maintained in populations of wild pigs (*Phacochoerus africanus*) and soft ticks from the Genus *Ornithodoros*. The bush pig (*Potamochoerus larvatus*) has also been showed to be asymptotically infected by the virus. In other parts of the African continent such as West Africa or Madagascar, the role of wild suids has not been demonstrated. The objectives of this study were to investigate the existence of a sylvatic cycle and its potential impact on the epidemiology of ASF in Senegal and Madagascar. . Samples from Malagasy bush pigs and Senegalese warthogs have been collected from areas of interface between domestic and wild pigs where ASF had been reported and analyzed for anti-ASF antibodies (ELISA) and viral DNA (PCR). Ticks were collected in pig farms and near wild suids resting areas, and their infection status with ASFV was determined using PCR. In addition, sera from wild suids and domestic pigs were tested for anti-tick antibodies (ELISA). The preliminary results obtained so far suggest that the epidemiologic cycle of ASF in Senegal and Madagascar does not involve the warthog-tick-domestic pig transmission described in East and South Africa.

INTRODUCTION

African swine fever (ASF) adversely affects pig production in the African continent and Madagascar. In southern and eastern Africa, the virus is maintained in populations of warthogs (*Phacochoerus africanus*) and soft ticks from the Genus *Ornithodoros* (Plowright *et al.*, 1994). The bush pig (*Potamochoerus larvatus*) has also been showed to be asymptotically infected by the virus (Anderson *et al.*, 1988). In Senegal and Madagascar, the role of wild pigs in the epidemiology of ASF has never been demonstrated. *Ornithodoros moubata* is present in Madagascar but not in Senegal. Although *Ornithodoros moubata* is not present in the Senegal, and ecologically and taxonomically similar soft tick, *O. sonrai*, is present in the country in human settlements and could act as a reservoir of the virus. The objective of this study was to investigate the existence of a sylvatic cycle for ASF in these two countries.

MATERIALS AND METHODS

In the Sine Saloum region (Senegal), 101 pig farms and 48 warthog burrows were inspected for soft ticks in four different areas. Sampled ticks were analysed by PCR amplification of VP72 gene B646L (Basto *et al.*, 2006). In addition, 162 warthogs samples (serum, filter paper and tissue samples) were collected in hunting camps and nature reserves from six different areas of Senegal and Mauritania over three years and analysed by a Blocking ELISA test (Ingenasa, Madrid, Spain).

In Madagascar, 27 sera samples and 35 blood and tissue samples were obtained from bush pigs in the region of Marovoay, where bush pigs (*P. larvatus*) are abundant and ASF had recently been reported by farmers. Samples were analyzed by different serological methods (Blocking ELISA, p30Recombinant ELISA and Western Blott) and PCR.

In addition, the 27 sera from bushpigs and 273 sera of pigs collected in three different areas of Madagascar were tested for antibodies against *O. moubata* salivary glands using an ELISA test (Canals *et al.*, 1990).

RESULTS

In Senegal, among the 101 inspected pig farms, *O. sonrai* was found in 44 farms. In 95% of cases, soft ticks were found inside rodent burrows situated close (25% at less than 10 m) to pig pens. Preliminary analysis of tick samples allowed the detection of ASFV DNA in three of them by PCR. A large sample of ticks still has to be analysed to assess the prevalence of infection. In natural areas, no tick was found within warthog burrows (n=48). However, some ticks were found in rodent burrows close to warthog resting sites. Among the 162 sera from warthogs, none was found positive to the Blocking ELISA.

In Madagascar, all samples from bush pigs were found negative for antibodies or direct detection of ASFV. The 27 bushpig sera were found negative for *O. moubata* salivary gland antibodies. Out of the 273 pig sera tested against *O. moubata* salivary gland antibodies, 51% were found positive, among which 7% were highly positive. The positive sera were collected in three different areas of Madagascar.

DISCUSSION

Although these results are only preliminary, they suggest that the epidemiologic cycle of ASF in Senegal and Madagascar does not involve the warthog-tick-domestic pig transmission otherwise described in East and South Africa. No virus has been detected in wild pigs in any of these two countries. Nevertheless, the ELISA test used has not been validated in wild suids and the results were not evaluated using a positive reference serum.

Very few reports are found regarding the involvement of wild pigs in the epidemiology of ASF in West Africa (Taylor *et al.*, 1977). Although our results suggest that this virus is not circulating in warthogs in Senegal, a red river hog (*Potamochoerus porcus*) has recently been found infected with ASFV in Nigeria (Luther *et al.*, 2007), which suggests that ASFV can circulate in West African populations of wild pigs. Further analysis of the samples collected in this study should be undertaken with more specific serological tests in order to definitely exclude the infection of warthogs with ASFV in Senegal. However, direct transmission from wild to domestic pigs seems unlikely since warthogs are scarce in the studied region due to overhunting.

The role of *O. sonrai* in the epidemiology of ASF in Senegal has not been confirmed. Despite the possibility of occasional contacts between *O. sonrai* and domestic pigs, this soft tick is not present in warthog burrows in Senegal and contacts between wild pigs and soft ticks seem very occasional. Experimental infections are necessary to confirm that *O. sonrai* can act as a vector of the disease. Therefore, our results suggest that the role of wild hosts in the epidemiology of the disease in Senegal, if not excluded, is probably negligible compared to the domestic pig cycle.

In Madagascar, ASFV has not been detected in bush pigs so far. However, our sample was small and probably insufficient to detect the low levels of infection observed in bush pigs in the African continent. The detection of antibodies against *O. moubata* in a large proportion of the pig sera tested by ELISA suggests that contacts between pigs and soft ticks might be more frequent than expected. Further studies are needed to confirm the presence of soft ticks in farms where pig sera contained anti-tick antibodies and the presence of ASFV in those ticks. The specificity of the ELISA test against antibodies from *O. moubata* also need to be evaluated. However, contacts between soft ticks and bush pigs are not likely to occur since bush pigs do not live in burrows. Therefore, the role of *O. moubata* in the maintenance of the disease is probably circumscribed to domestic pigs.

Our study suggests that the epidemiological cycles of ASFV in West Africa and Madagascar are different from those described in other regions of Africa. If it exists, the sylvatic cycle is likely to be limited to a tick-domestic pig cycle. Further studies will be undertaken in order to confirm or exclude the hypothesis of a sylvatic cycle involving wild hosts in Senegal and Madagascar. Its importance in the epidemiology of the disease should also be investigated using analytical tools such as risk mapping, risk assessment or transmission models.

Acknowledgements

We would like to express our gratitude to the Veterinary Services of Madagascar and Maison du Petit Elevage for supporting this work. We would also like to thank Prof. Antonio Encinas Grandes from the University of Salamanca for his availability and cooperation regarding the salival gland ELISA test. Finally, we are very grateful to Emmanuel Albina and personnel from ASF reference laboratory in Montpellier and Barbara Wieland (IAH/RVC) for their support in the laboratory analysis.

REFERENCES

- Anderson E.C., Hutchings G.H., Mukarati N., Wilkinson P.J., 1998. African swine fever infection of the bushpig (*Potamochoerus porcus*) and its significance in the epidemiology of the disease. *Veterinary Microbiology*, 62: 1-15.
- Canals, A., Oleaga A., Perez R., Dominguez J., Encinas A., Sanchez-Vizcaino J.M., 1990. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific antibodies in pigs infested with the tick *Ornithodoros erraticus* (Argasidae). *Veterinary Parasitology* 37: 145-53.
- Luther N.J., Majiyagbe K.A., Shamaki D., Lombin L.H., Antiagbong J.F., Bitrus Y., Owolodun O., 2007. Detection of African swine fever virus genomic DNA in a Nigerian red river hog (*Potamochoerus porcus*). *Veterinary Record*, 160 (2): 58-9.
- Plowright W., Thomson G.R., and Naser, J.A., 1994. African swine fever. *In*: Coetzer, J.A., Thomson, G.R., Tustin R.C. *Infectious Diseases of Livestock with Special reference to Southern Africa*. Oxford University Press, p. 568-600.
- Taylor W.P, Best J.R., Colquhoun I.R., 1977. Absence of African swine fever from Nigerian warthogs. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, 25:196-203.








Vial L., Ravaomanana J., Le Glaunec G., Karim Ndiaye R., Wieland B., Costard S., Etter E., Jori F., Dixon L., Pfeiffer D., Roger F.

PESTE PORCINE AFRICAINE ET TIQUES:

**EVALUATION DES RISQUES
D'EMERGENCE ET DE DIFFUSION PAR
DES APPROCHES MECANISTIQUES ET
ECO-EPIDEMIOLOGIQUES**

ANNEXE 3

Plaquette de présentation du projet Wellcome Trust sur la PPA à Madagascar



Epidemiological Studies of African Swine Fever in Madagascar

Costard S.¹, Pfeiffer D.¹, Roger F.², Vidon H.³, Rakotoharinome M.⁴, Ravaomanana J.⁵, Randriamparany T.⁴, Jori F.², Vial L.², Wieland B.¹

¹Royal Veterinary College, UK; ²CIRAD, France; ³MPE, Madagascar; ⁴DSAPS, Madagascar; ⁵FOFIFA, Madagascar

E-mail: scostard@rvc.ac.uk



Figure 1: Study areas in Madagascar

Context

African Swine Fever (ASF) has been introduced to Madagascar in 1998 and resulted in severe losses and the collapse of the pig industry. The disease is now endemic in most parts of the country and regular outbreaks constrain the pig production.

Various ecosystems with specific wildlife are present in Madagascar, a fact which is likely to influence the role of the sylvatic cycle in the epidemiology of ASF. As a result, this country provides a unique opportunity to study key aspects of the ASF epidemiology.

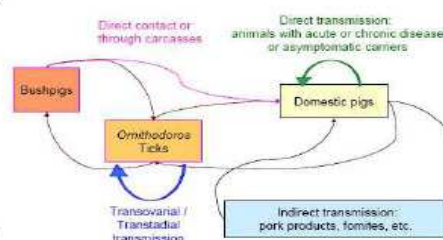


Figure 2: Potential transmission pathways of ASF in Madagascar

General Objectives of the project

Better understanding of the epidemiology of ASF in Madagascar

- Most important factors influencing the spread of infection between domestic pigs
- Roles of and interactions between wildlife reservoirs and domestic pigs for maintenance and transmission of the ASF virus

Development of tools to inform the development of control measures

Specific Objectives & Methods

1) Epidemiological studies of pig production

To understand the dynamics of the pig production system, and to assess the between-herd transmission of ASF

- Baseline study of actors and flows using a questionnaire survey (on-going)
- Prevalence study based on biological sampling in abattoirs and at strategic stages of the production chain (2006)
- Questionnaire-based case-control study to identify risk factors (2006/2007)

2) Epidemiological studies on wildlife

To understand the role of wild reservoirs in the transmission of the disease

- Biological sampling of bushpigs to evaluate ASFV circulation in wild swine populations (2006)
- Collection of ticks in the field to assess tick distribution and ASFV circulation in this host (2006)
- Serological testing of domestic/wild pigs to investigate contacts with ticks (2006)

3) Molecular epidemiology

To further investigate the interactions between hosts

- Assessment of genetic variability of ASF virus isolated from different hosts

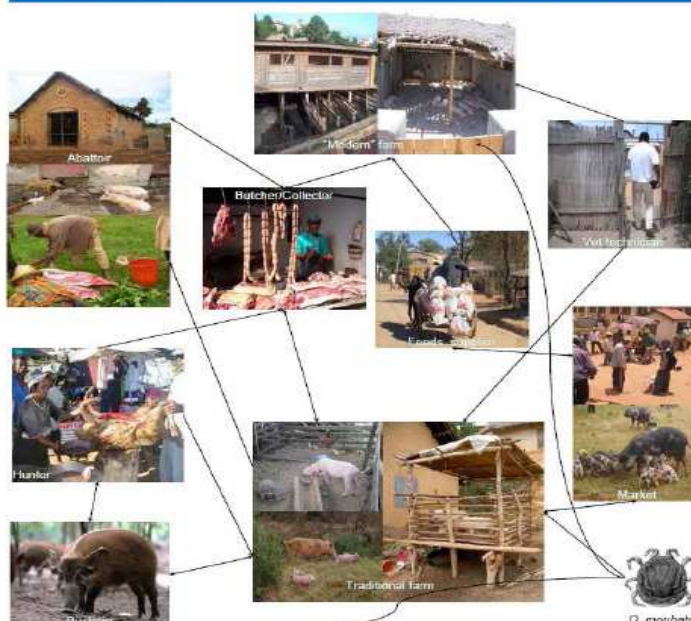


Figure 3: Possible actors and flows involved in the transmission of ASF

Expected Outputs

For each study area: Prevalence of ASF, risk factors for ASF, information on the structure of the pig production system.

Model of the between-farm transmission of the disease (see corresponding poster).

Risk assessment for the introduction of ASF to pig farms and risk mapping for the sylvatic cycle.

Simulation of the impact of control strategies using different scenarios.

Acknowledgements:

We thank all collaborators in Madagascar without whom this study would not be possible

This study is funded by the Wellcome Trust

wellcometrust

ANNEXE 4

Fiche de commémoratifs et de collecte des tiques

Date : Pays :
Nom/Prénom de l'éleveur : Coordonnées GPS : S
Adresse : Fokontany/commune : E
Zone d'étude (code):
Type d'élevage : Traditionnel Moderne
Elevage existant depuis :

Description des bâtiments : * Plusieurs choix peuvent être entourés pour une même catégorie

Nombre de bâtiments :

Type de bâtiments* : Sol : Ciment /béton
Sable
Terre
Plancher en bois
Plancher en brique
Autre :
Litière : Paille
Son/balles de riz
Copeaux
Pas de litière
Autre :
Murs/clôtures : Ciment /béton
Enduit/terre
Briques
Pierres
Planches/poteaux en bois (avec espaces)
Palissage en bois (sans espaces)
Grillage
Tôles
Autre :
Toit : Tôles
Paille/feuilles
Tuiles
Autre :
Charpente : Bois
Métal
Autre :
Existe-t-il plusieurs cases dans les bâtiments : Oui Non
Si oui, celles-ci sont séparées par : Ciment/béton
Mur de terre
Mur de pierres
Briques

Barrières en bois (avec espaces)
 Palissade en bois (sans espaces)
 Grillage
 Tôles
 Autre :

Description des pratiques d'élevage :

Type d'élevage : Naisseur
 Naisseur-engraisseur
 Engraisseur
 Verratier

Race : Locale Améliorée Mixte

Nombre de porcs : Truies
 Verrats
 Porcs à l'engraissement
 Porcelets sous la mère

Claustration des porcs : Claustration permanente
 Divagation totale
 En liberté quelques heures par jour
 Au piquet
 Autre :

Si aucune : localiser et décrire le lieu de couchage des porcs :

Proximité avec une forêt : Oui Non
 Si oui : présence de potamochères/phacochères : Oui Non
 Si oui : contact possible avec les porcs de l'élevage : Oui Non

Les éleveurs ont-ils déjà observé des hybrides porc/potamochère : Oui Non

Modes de vente des animaux (préciser la commune du lieu de vente dans la case correspondante):

| Mode de vente | Truies | Verrat | Porc engraisse | Porcelet |
|----------------------------------|--------|--------|----------------|----------|
| Marche | | | | |
| Collecteur | | | | |
| Boucher | | | | |
| Eleveur | | | | |
| Autre : | | | | |
| Pas de vente (cocher la case) | | | | |

Modes d'achat des animaux (préciser la commune d'origine dans la case correspondante):

| Mode d'achat | Truies | Verrat | Porc à engraisser |
|---------------------------------|--------|--------|-------------------|
| Marche | | | |
| Collecteur | | | |
| Eleveur | | | |
| Auto-renouvellement | | | |
| Autre :..... | | | |
| Pas d'achat (cocher la case) | | | |

Méthode de reproduction : Monte naturelle avec verrat(s) de l'élevage
 Monte naturelle avec verrat d'un autre élevage
 Insémination Artificielle

Si monte avec verrat(s) de l'élevage, également utilise dans d'autres élevages? Oui Non

Si verrat de l'élevage utilise ailleurs ou si monte avec le verrat d'un autre élevage, mode de transport des truies ou verrat(s) entre les différents élevages : A pied
 A moto/auto/camion
 A charrette

Personnes sont autorisées à rentrer dans l'élevage : Collecteurs
 Bouchers
 Verratier
 Provendier
 Amis/Famille
 Autres éleveurs de porcs
 Techniciens / Vétérinaires
 Autre:
 Personne n'est autorisée

Véhicules pouvant rentrer dans l'élevage : Auto/Camion
 Moto
 Charrette/Pousse-pousse
 Autre:.....
 Aucun véhicule n'est autorisé

Matériel en commun avec d'autres exploitations ? Oui Non
 Si oui, précisez :.....

Traitements : Bâtiments : Oui Non Produit :
 Porcs : Oui Non Produit :

 Maladies : PPA : Oui Non Dates :
 Autres : Oui Non Lesquelles :
 Dates :

Recherche de tiques dans les bâtiments:

Nombre de bâtiments examinés :

| Zones examinées | Présence (nombre) | Absence | Commentaires |
|----------------------|-------------------|---------|--------------|
| Autour des bâtiments | | | |
| - Intérieur | | | |
| - Extérieur | | | |
| Sol | | | |
| - Crevasses/trous | | | |
| - Terriers rongeurs | | | |
| Litière | | | |
| Murs | | | |
| Clôture | | | |
| Charpente | | | |
| Toit | | | |

ANNEXE 5

Fiche d'enquête chasseur de potamochères

Nous cherchons à décrire l'activité de chasseur de potamochère dans votre région, et voudrions pour cela vous poser quelques questions sur vos méthodes de travail. Les réponses que vous donnez resteront confidentielles et les résultats de l'enquête seront fournis de manière globale et anonyme. La description de la production porcine et du commerce de viande de potamochère dans votre région est la base d'un travail cherchant à identifier les risques de transmissions de la PPA, afin d'aider à la mise en place de mesures de lutte contre cette maladie. Les réponses que vous donnerez à ce questionnaire sont donc des informations importantes, merci d'y répondre aussi objectivement que possible.

1. Nom.....
2. Adresse..... 3. Commune.....
4. Fokontany :
5. Code zone :

Description de l'activité de chasse de potamochère

6. En quelle année avez-vous commencé à chasser le potamochère ?
7. En plus de cette activité de chasseur, exercez-vous une/plusieurs des activités suivantes ?
 - Eleveur de porcs
 - Boucher / Commerçant de viande
 - Collecteur /transporteur de produits ou animaux d'élevage
 - Autre :
 - Pas d'autre activité
8. La Peste Porcine Africaine a-t-elle eu un impact économique sur votre activité de chasseur?
 - Amélioration
 - Détérioration
 - Pas d'impact

Dans cette partie du questionnaire, nous allons vous poser des questions sur vos méthodes de chasse.

9. Comment chassez-vous le potamochère ?
 - vous abattez les animaux (fusil, etc.)
 - vous capturez les animaux dans des pièges traditionnels
 - autre méthode :
10. Quel(s) type(s) de potamochère(s) chassez-vous:
 - males adultes
 - femelles adultes
 - femelles gestantes
 - jeunes
 - autre :
 - indifférent
11. A quelle période de l'année chassez-vous le potamochère ?
 - toute l'année
 - en période de chasse

Si la personne chasse toute l'année, passer à la question 13. Sinon, répondre à la question 12.

12. Si vous ne chassez qu'en période de chasse ou a certaines périodes de l'année, pouvez vous entourer ci-dessous les mois concernés ?

J F M A M J J A S O N D

13. Nous aimerions savoir pour quelles raisons vous chassez : pour vendre la viande, consommer la viande vous-même et votre famille, abattre des animaux nuisibles, etc.).

Chassez-vous donc :

- pour autoconsommation
- sur demande de particuliers quand les potamochères sont considérés nuisibles (destruction des champs, porcs tués/blessés suite à un contact avec un potamochère, etc.)
- sur demande d'un boucher / transformateur (hôtely...) / revendeur de viande
- sur demande de particuliers pour leur consommation
- régulièrement pour approvisionner des particuliers et/ou des revendeurs, mais sans attendre leur commande
- autre :

14. Chassez-vous toujours dans la(les) même(s) zone(s) ? Oui Non

Si oui, passer à la question 16. Si non, répondre à la question 15.

15. Si vous ne chassez pas toujours dans les mêmes zones, pour quelle(s) raison(s) variez-vous vos lieux de chasse ?

.....
.....
.....

16. Pourriez-vous indiquer vos zones de chasse, notamment les noms des communes dans lesquelles elles se trouvent ?

.....
.....
.....

17. Vous arrive-t-il de chasser le potamochère à proximité d'élevages porcins ?

- Tout le temps
- Très souvent
- Souvent
- Parfois
- Jamais

18. Le nombre de potamochères que vous chassez chaque mois varie-t-il avec les saisons ?

Oui Non

Si oui, passer à la question 19. Si non, aller à la question 21.

19. Pouvez-vous entourer les mois où vous chassez le plus de potamochères ?

J F M A M J J A S O N D

20. Selon vous, à quoi sont dues ces variations saisonnières ?

.....
.....
.....

21. En moyenne, sur toute la période pendant laquelle vous chassez, combien de potamochères chassez-vous par mois ?

Avec les questions 22 à 27, nous cherchons à connaître votre avis sur les éventuelles variations de la taille de la population de potamochères.

22. Y a-t-il des variations d'effectif de population de potamochères sur l'année ?

Oui Non
Si oui, répondre a la question suivante. Sinon, passer a la question 24.

23. Pouvez-vous décrire cette variation saisonnière de taille de la population de potamochères ?
.....
.....
.....

24. Avez-vous remarqué un changement de la taille de population de potamochères au cours des 10 dernières années ? Oui Non
Si oui, passer a la question suivante. Sinon, aller a la question 28.

25. Le nombre global de potamochères a-t-il :
augmente
diminue
autre :.....

26. Depuis quelle année environ pensez-vous que ce changement a eu lieu ?

27. Pouvez-vous donner des raison(s) possible(s) pour expliquer ce changement ?
.....
.....
.....

Transport des potamochères chasses

Nous allons vous poser quelques questions sur la manière dont vous transportez les potamochères chasses, abattus ou captures.

28. Quel mode de transport utilisez-vous entre le lieu de chasse et le lieu de garde (enclos) des potamochères?
Camion/fourgon
voiture
Charrette/ pousse-pousse
A pied
Vélo / moto
Autre :..... les
potamochères sont abattus sur le lieu de chasse (passer a la question 30)

29. Quel mode de transport utilisez-vous entre le lieu de garde des animaux captures et le lieu d'abattage?
Camion/fourgon
voiture
Charrette/ pousse-pousse
A pied
Vélo / moto
Autre :.....
Abattage sur lieu de garde

30. Quel mode de transport utilisez-vous entre le lieu d'abattage des potamochères et le lieu de vente ?
Camion/fourgon
voiture
Charrette/ pousse-pousse
A pied
Vélo / moto
Autre :.....
Autoconsommation seulement (pas de vente)

31. Vous arrive-t-il de transporter d'autres produits ou animaux en même temps que les potamochères chasses ?

- toujours
- très souvent
- souvent
- parfois
- jamais

32. Vous arrive-t-il de rentrer dans des élevages de porc ?

- tous les jours
- très souvent
- souvent
- parfois
- jamais

33. Effectuez-vous une désinfection des vêtements, chaussures et/ou du véhicule que vous utilisez pour chasser le potamochère ou le transporter ?

- Oui Non

Si oui, passer a la question suivante. Sinon, passer a la section suivante.

34. Que désinfectez-vous (plusieurs réponses possibles) ?

- votre véhicule avant de transporter les potamochères ou leurs carcasses
- votre véhicule après avoir transporté les potamochères ou leurs carcasses
- vos avant de transporter les potamochères ou leurs carcasses
- vos vêtements et chaussures après avoir transporté les potamochères ou leurs carcasses
- autre :

35. Quelle(s) méthode(s) de désinfection utilisez-vous ?

- pédiluve
- rotoluve pour le véhicule
- pulvérisateur
- autre :

36. Quel produit et quelle dilution utilisez-vous ?

.....
.....

Garde et abattage des potamochères captures

Si vous abattez les potamochères lors de la chasse, passez directement a la section suivante : Abattage des potamochères.

Dans le cas ou vous capturez les potamochères dans un premier temps, nous voudrions vous poser quelques questions sur le lieu dans lequel vous gardez les animaux ainsi chasses.

37. De quel(s) matériau(x) est fait l'enclos dans lequel vous gardez les potamochères captures ?

- palissade
- Murs
- Grillage
- Autre :

38. Sur quelle commune se trouve ce lieu de garde ?

39. A quelle distance du lieu de chasse (Km) se trouve ce lieu de garde ?

40. En moyenne, combien de temps (jours) gardez-vous les potamochères captures avant de les abattre ?

41. Pendant cette période, est-il possible que les potamochères soient en contact avec un des animaux suivants:

- chiens / chats

volaille
porcs
autre :
pas de contact possible

42. Les potamochères sont-ils gardés à moins de 100m d'élevages de porcs ?
Oui Non

43. Pouvez-vous préciser où les potamochères capturées sont abattues ?
à votre domicile
sur le lieu de garde (si différent de votre domicile)
sur le marché
chez le boucher
autre :

44. Sur quelle(s) commune(s) se fait cet abattage ?
.....

45. A quelle distance (Km) du lieu de garde se fait l'abattage des potamochères?.....

Abattage des potamochères

Nous voudrions

46. Lors de l'abattage, les déchets de carcasses sont-ils :
laissés sur le lieu d'abattage
jetés à proximité du lieu d'abattage, sans rien pour les protéger
jetés dans une fosse
détruits :
autre :

47. Des animaux non destinés à l'abattage (chiens, volaille, etc.) ont-ils accès :
au lieu d'abattage des potamochères
à l'endroit où les déchets de carcasses de potamochère sont jetés
pas d'accès à ces différents lieux

Si vous exercez une activité de boucher, grossiste, vendeur à des professionnels ou à des particuliers, ou restaurateur (hôtel ou restaurant), se reporter à la fiche « boucher »
Si vous effectuez une transformation de la viande (fumage, séchage ou autre), se reporter à la fiche « boucher ».

ANNEXE 6

Fiche de renseignements accompagnant les prélèvements

Collection d'échantillon PPA à Madagascar (MA)

Remplir une fiche de commémoratifs pour chaque prélèvement (ou groupe de prélèvements s'ils proviennent du même endroit). Attention de ne pas prélever plus de 5 échantillons de la même origine (troupeau, point de chasse).

Nom de la personne ayant collecté

l'échantillon:.....

Date du prélèvement (jj/mm/aa):/...../.....

Espèce concernée: I P porc I B potamochères I W phacochères I T tiques

Zone de collecte: I RI Arivonimamo I MB Ambatondrazaka I RO Marovoay

Lieu de collecte : I abattoir I point de collection I marché I élevage

I brousse I forêt I autres.....

Informations géographiques:

Commune:

Coordonnées UTM (WGS 34):

Distance de l'élevage de porcs le plus proche:

I < 50 m I 50 – 100m I 100 – 500 m I 500 – 1000 m

I 1 – 5 km I 5 – 10 km I 10 – 20 km I > 20 km

Informations complémentaires pour les porcs:

Nom de l'éleveur:I

inconnu

Adresse:.....

Type d'élevage: I divagation I fermier I commercial semi-fermé I commercial fermé

Nombre d'animaux:..... **Race:** I locale I Large White I Landrace I Piétrain

I Duroc I Chinois I autre.....

Est-ce que la PPA a été suspectée dans l'élevage auparavant?

I non I en 2006 I en 2005 I avant 2005

Informations complémentaires pour tiques:

Lieu de collecte : I terrier I fissure I sur porc I sur autre mammifère.....

Code d'échantillon:

A chaque animal ou chaque tube de tiques doit être attribué un code unique au format

XXYYZjjmmaa.000

XX: code du pays (MA)

YY: code de la zone d'étude (RI, MB, RO)

Z: espèce collectée (P, B, W, T)

jjmmaa: date de la collecte

000: numéro de collecte continu du jour dans la même région

IMPORTANT: Afin d'éviter toute duplication, il faut vous souvenir du dernier numéro 000 attribué lors de la

précédente collecte d'échantillons, le même jour.

Tous les prélèvements réalisés sur le même animal (sang, sérum, papier buvard, organes...) auront le même code

d'échantillon. Le code d'échantillon définitif sera ensuite attribué par le laboratoire

(XXYYZjjmmaa.A000, ou le A

représente le type de prélèvements).

Pour les tiques : utilisez le premier chiffre du 000 pour énumérer les tubes. Un code unique utilisant les 2

derniers chiffres du 000 sera ensuite attribué aux tiques individuelles au laboratoire.

ANNEXE 7

Les différents types de porcherie trouvés dans les zones d'étude



Figure : Un type de porcherie à Marovoay



Figure : Un type de porcherie à Ambatondrazaka



Figure : Un type de porcherie à Arivonimamo



Figure : Un type de porcherie à Mahitsy

ANNEXE 8

Les différentes étapes pour l'obtention des échantillons de potamochères



Figure : Capture de potamochère vivant par piégeage



Figure : Transport des potamochères vivants



Figure : Abattage et flambage de potamochère



Figure : autopsie d'un potamochère



Figure : carcasse et organes déchiquetés



Figure : Organes (rate : pour le prélèvement au laboratoire)

ANNEXE 9

Les différentes étapes pour la recherche des tiques



Figure : Enquête sur la conduite d'élevage de porc auprès des éleveurs avant la collecte des tiques



Figure : Collecte des tiques (manuellement) dans la porcherie



Figure : Collecte des tiques avec un aspirateur



Figure : Exposition au soleil des débris collectés pour cibler les tiques



Figure : Les tiques ciblées



Figure : Les tiques collectées

ANNEXE 10






Récapitulatif de tests utilisés pour les analyses virologique et sérologique

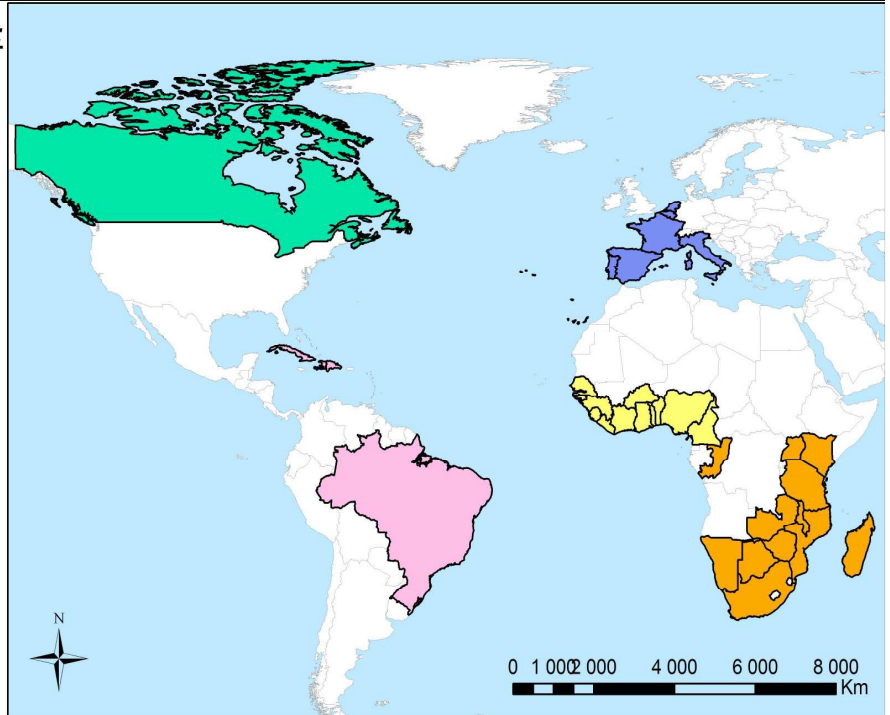
| TESTS | Performances/ Confidence | <i>Confidence</i> % | Se mode (%) | Se percentage (%) | Beta distribution (a,b) for Se | | Sp mode (%) | Sp percentag e (%) | Beta distribution (a,b) for Sp | | Total number of samples | Number Positive samples | p freedom (cut-off 5%) |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------|-------------|----------------------|-----------------------------------|-------|----------------|--------------------------|-----------------------------------|-------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Bushpig | | | | | | | | | | | | | |
| ASFv PCR | High/High | 95 | 99 | 95 | 88.280 | 1.882 | 99 | 95 | 88.280 | 1.882 | 35 | 0 | 0,84 |
| bELISA ASF Ab (INGENASA) | moderate/moderate | 80 | 95 | 90 | 40.578 | 3.083 | 95 | 90 | 40.578 | 3.083 | 27 | 0 | 0,73 |
| p30 ELISA ASF Ab | moderate/moderate | 80 | 95 | 90 | 40.578 | 3.083 | 95 | 90 | 40.578 | 3.083 | 27 | 0 | 0,73 |
| Western Blot ASF Ab | High/High | 95 | 99 | 95 | 88.280 | 1.882 | 99 | 95 | 88.280 | 1.882 | 27 | 0 | 0,75 |
| ELISA <i>O. moubata</i> Ab | Moderate (Se) – Low (Sp)/low | 50 | 90 | 80 | 4.727 | 1.414 | 80 | 70 | 3,212 | 1,553 | 27 | 0 | 0,71 |
| Domestic pig | | | | | | | | | | | | | |
| ELISA <i>O. moubata</i> Ab | Moderate (Se) – Low (Sp)/low | 50 | 90 | 80 | 4.727 | 1.414 | 80 | 70 | 3,212 | 1,553 | 118 | 7 | 0,63 |

ANNEXE 11

Distribution géographique des tiques molles Ornithodores pouvant héberger le virus de la PPA

Tiques molles Ornithodores :

-  **O. porcinus**
(Plowright et al, 1969)
-  **O. sonrai**
(Vial et al, 2007)
-  **O. coriaceus**
(Groocock et al, 1980)
O. turiceta
(Hers et al, 1987)
-  **O. puertoricensis**
(Endris et al, 1981)
-  **O. erraticus**
(Sanchez-Botija, 1985)



ANNEXE 12

| |
|---|
| Protocole d'utilisation de papier buvard FTA |
|---|



Whatman FTA Protocol BD08

Preparing an FTA[®] Disc for DNA Analysis

FTA[®] Technology

FTA Cards are impregnated with a patented chemical formula that lyses cell membranes and denatures proteins on contact. Nucleic acids are physically entrapped, immobilised and stabilised for storage at room temperature. FTA Cards protect nucleic acids from nucleases, oxidation, UV damage and microbial and fungal attack. Infectious pathogens in samples applied to FTA Cards are rendered inactive on contact. Samples collected on FTA Cards and enclosed in a multi-barrier pouch can be shipped through the post making them an extremely useful tool for field collection of blood, plants or other specimens.

Indicating FTA Cards turn from pink to white on sample application and are recommended for clear or colourless samples. CloneSaver[™] Cards are optimised for the room temperature collection and storage of plasmid DNA.

Handling Instructions

- Always wear gloves when handling FTA or CloneSaver Cards to avoid contamination of the Cards.
- Store unused FTA/CloneSaver Cards in a cool, dry place (avoid light and excessive humidity).
- Follow universal precautions when working with biological samples.
- FTA/CloneSaver Cards are non-toxic to humans.

Materials Required

- Whatman FTA Card – Indicating FTA Cards are recommended for use with clear samples. If applied to non-Indicating Cards, circle the application spot with a ballpoint pen or pencil.
- Whatman FTA purification reagent (cat no. WB120204).
- TE⁻¹ buffer (10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH 8.0).
- 1.2mm or 2.0mm diameter Harris micro punch or other paper punch.
- Multi-barrier pouch (cat no. WB100010 – large, WB100011 – small).
- Desiccant pack for glycerol stock or high humidity storage areas (cat no. WB100003).
- Whatman FTA Protocol BD09 “Removing a Sample Disc from an FTA or CloneSaver Card for Analysis”.

The FTA Principle – Get it Right First Time, Every Time

FTA works by lysis of cells releasing the nucleic acid within the matrix of the Card, where the nucleic acid will be entrapped among the cellulose fibres. Therefore the key step to ensure success is getting DNA-containing cells into the FTA in the presence of moisture to activate the cell-lytic and DNA-protective chemicals.

The processing of FTA works by washing away all cell debris and inhibitors of downstream analysis, leaving the DNA immobilised in the cellulose fibres. It is therefore essential that a good wash protocol is followed. Note: a good wash can be visualised in the processing of coloured samples such as blood and plants, where all of the red or green colour would have been removed from the punch. Insufficient washing can mean failure of your downstream analysis.

Controls

It is recommended that internal standard controls are used during each PCR analysis, these should include the following:

- Negative control.
- Negative control with washed, no-sample punch, to ensure that the punch does not cause a positive result.
- Positive control of a known DNA standard solution.
- Positive control standard added to a normally-washed, no-sample punch, to ensure that the punch does not inhibit the reaction.

Protocol

1. Take a sample disc from the dried spot following the instructions provided in the protocol entitled "Removing a Sample Disc from an FTA or CloneSaver Card for Analysis", protocol number BD09.
2. Place disc in PCR amplification tube.
3. Add 200µL of FTA Purification Reagent to PCR tube.
4. Incubate for 5 minutes at room temperature (the tube should be given moderate manual mixing to disrupt the debris and aid in washing).
5. Remove and discard all used FTA Purification Reagent using a pipette.
6. For blood or plant presses, repeat steps 3-5 twice, for a total of 3 washes with FTA Purification Reagent. For bacterial samples, repeat steps 3-5 once, for a total of 2 washes with FTA Purification Reagent.
7. Add 200µL of TE⁻¹ Buffer (10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH 8.0).
8. Incubate for 5 minutes at room temperature.
9. Remove and discard all used TE⁻¹ Buffer with a pipette.
10. Repeat steps 7-9 once for a total of 2 washes with TE⁻¹ Buffer.
11. Ensure that all the liquid has been removed before performing analysis. The disk may be allowed to dry.

It is recommended that analysis be conducted within 3 hours of the disc washing. If this is not possible, the punch can be stored at 4°C or -20°C in a dark environment for up to 1 week.

Preparation for Analysis

PCR

- The washed and air-dried (optional) disc is now ready for analysis by PCR using standard protocols.
- The disc is included in the PCR reaction.
- There is no need to change reaction volume or PCR conditions due to the presence of the disc.
- For the PCR it can be safely assumed that the punch + DNA constitutes zero added volume.
- For PCR analysis of Genomic DNA on a 1.2mm or 2.0mm disc of FTA, on FTA a reaction volume between 25-50µL is recommended.
- For some species of plant a 2.0mm punch may contain too much DNA causing the PCR reaction to be inhibited. In this situation a 1.2mm punch can be used in as much as 50µL of PCR reaction mix.

STR (Short Tandem Repeats)

- The washed and air-dried (optional) disc is now ready for STR analysis. A 1.2mm disc contains about 5-20ng DNA. Accordingly, an appropriate cycle number for this high quantity of DNA is 24

cycles, the amplification is performed directly in the MicroAmp tube.

- STR profiles have been successfully generated with 1.2mm FTA discs using kits from Applied BioSystems and Promega.

Technical Help

If you experience any problems with this protocol or wish to obtain additional information please contact Whatman Technical Service Team on the following regional numbers. Alternatively, please visit www.whatman.com for additional product information and further contact details.

North America 1-800-WHATMAN

Europe +44(0)1622 676670 – ask for technical service

Japan +81(0)3 2515 1242 – ask for technical service

Asia Pacific +65 6534 0138 – ask for technical service

China +86 21 6443 7176 – ask for technical service

India +91 22 529 7035 – ask for technical service

For Additional Protocol Information Please Visit

www.whatman.com

ANNEXE 13

Protocole du projet Wellcome Trust

(www.asfnetwork.org)

Introduction

This document has been put together in collaboration of partners involved in the Wellcome Trust ASF project and compiles experiences gained in previous projects on ASF Virus. The document aims at giving guidelines of how to transport samples and lists laboratory protocols that are recommended to apply for the analysis of samples collected in the field in the context of the WT ASF project.

For most of the ASF diagnostic tests Sensitivity (Se) and Specificity (Sp) have never been established using a representative sample, a fact that hinders the interpretation of results in prevalence studies. Therefore one of the objectives is to evaluate the performance of these tests. To do so, samples from the same animal need to be analysed by independent methods. This may seem to be redundant at first sight, however we need to do this in order to have accurate data for further analysis and the quality of the interpretation of results will substantially be improved. Se and Sp of the various tests will be determined using the so called 'latent class analysis', a Bayesian based approach which is used in the absence of a gold standard. This approach allows the assessment of the performance of several tests when applied in two different populations, preferably with different disease prevalence. As we need to get as much data as possible to run this analysis in the first place, it is most of all important in the early stages of the project to analyse the samples with various methods. As soon as we know more on the performance of each of the diagnostic methods, the number of different tests that are run on each sample will be reduced. The list below gives the tests and the respective protocol we think are useful to perform. In each section the tests are listed according to priority. We strongly recommend that all partners use the same protocols. Only like this, we will be able to compare the results and to determine the Se and Sp of the tests. Ideally of each sampled animal a blood sample, blood on filter paper and a tissue samples are taken.

We also plan to organise a ring test in autumn to assess the agreement between involved laboratories. In addition, we recommend to laboratories in Madagascar, Senegal, Mozambique and DR Congo to send about 10% of all samples to OVI (Mozambique and Madagascar) and to the IAH (Senegal and DR Congo). The samples will be retested and of the positive samples p72 and 9RL (B602L0 will be sequenced for molecular epidemiological investigations.

The following protocols can be downloaded from the ASF network website (www.asfnetwork.org)

Collection, transport and storage of samples

Blood samples

Blood

Collect 5ml in standard Vacutainers. Store upside down and leave at room temperature for 12-24h. Remove the blood clot and store the serum at 4 °C (in a cold box surrounded by ice packs) during transport to the lab.

For wild pigs, it is also recommended to collect blood stored in tubes with anticoagulant (EDTA). Store cool if possible during transport. Freeze at -70°C as soon as possible to retain virus infectivity. Infectivity is destroyed by storage at -20°C, but may be retained for weeks to months if stored at 4 °C and antibodies and DNA should be detected over longer periods of possibly several months with storage at 4°C.

Filter papers

Whatman 3M filter paper. Collect ~ 100 µl (6-10 drops) blood on 1 X 5 cm strips and dry. Store in sealed plastic bags with silica gel dessicant. Store at 4 °C during transport (stable at up to 25 °C for ~ 6 months).

Whatman FTA filter paper. Collect ~ 100 µl (6-10 drops) blood on individual filter papers and dry for at least one hour (not in the sun). Follow the spotting and drying instructions in the protocol supplied with the filter papers. Use sealed plastic bags with silica gel for transport at 4 °C. Store the filter papers in plastic bags containing silica gel in a cool dark location (stable at up to 25 °C for ~ 6 months).

Tissue samples

If possible, collect spleen samples. Alternatively, take lymph nodes samples.

Collect samples of approximately 1cm diameter. Add a PBS solution containing antibiotics (100 µg /ml penicillin and streptomycin) and store at 4 °C during transport. Freeze at -80°C as soon as possible to retain virus infectivity. Infectivity is destroyed by storage at -20°C, but may be retained for several weeks if stored at 4 °C and antibodies and DNA should be detected over longer periods up to possibly several months with storage at 4°C.

Ticks

Transport ticks alive in tubes with air holes in the top. Store alive or at -70 °C to retain virus infectivity. For long term storage, use a tube of about 5 cm diameter and 10 cm high containing a piece of filter paper. Live ticks should be kept in a cool place (20 -25°C) where humidity can be maintained (p.e. by adding a piece of humid cotton in the tube) make very little holes in the cover of the tube and use finely woven nylon tissue below the cover.

Alternatively, ticks may be stored at -20 °C or in 70% ethanol, however in that case only virus detection by PCR is possible. Storage in ethanol: in 1.5 ml nunc tubes with screw and plastic gasket cover, maintain no more than 1 volume of ticks for 9 volume of alcohol.

Test protocols

Working in the laboratory and labelling of samples: please follow the guidelines of sample labelling. We would like to encourage all laboratories involved in the ASF diagnosis to use the excel or access file `WT ASF samples` to record the samples and the respective test results. This approach allows a high level of harmonisation of the information recorded in the various laboratories and facilitates the data compilation for further analysis. Each animal or each tube with ticks gets a unique sample label with the format **XXYYZddmmyy.A000**, where:

XX: country code (MO, MA, SE, CO)

YY: region code (3-8 codes per country)

Z: species of sampled animal (P=pig, B=bushpig, W=warthog, T=tick)

ddmmyy: sampling date

A: sample type (A=tick, B=blood, C=Whatman 3M filter paper, D=FTA filter paper, E= tissue lymphnode, F= tissue spleen, G= other tissue, H=other)

000: sample number of the day in the same region

For ticks the first digit of the 000 number is used to number the tubes, single ticks are given a unique identification upon testing in the laboratory using the last two digits of the 000 number.

We advice to use a labelling machine (for example Brother P-touch 2450 DX Label Maker) to label the sample tubes for long-term storage or transport. Make sure that the labels stick well.

DNA extraction

There are various useful kits for DNA extraction available. Known from experience, good results were obtained using the High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) where of 200 µl of tick supernatant or virus suspension DNA is recovered in a final volume of 50-65µl, also the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) or Amersham GFX Genomic Blood DNA Purification kit (Cat 27-9603-01) have been used for extraction of DNA from tick homogenates, tissues and from blood. To obtain tick homogenate, sterilise tick surface with a 10 % hypochlorite solution. Homogenise ticks using a syringe and needle in 0.5 ml RPMI medium supplemented with 20 % foetal calf serum and 50 U/ml of penicillin, streptomycin and fungizone. Freeze ticks at -70 °C. Individual homogenised ticks or organs/tissues are best grinded with sterile sand.

For DNA purification of blood samples on filter papers use the protocol by Whatman: `stamp out` discs of 2mm diameter with a Whatman Harris Micro PunchTM, wash the discs 3 times with the FTA DNA purification reagent and rinse twice for 5 minutes with TE-1 buffer. The washed discs should not have any red colour left. Let the discs dry for 1 hour before use.

Virus detection

PCR on blood (serum) samples

There are various protocols that have been proved to be useful for virus detection. We propose to use the primers described by Basto et al. (2) as they have the advantage of

generating a larger product which will make it easier to interpret when analysing the products on an agarose gel. In addition this method has the advantage of having an internal control which allows assessment of the presence of inhibitors (protocol 3.2.2). A list of alternative protocols is given in section 3.2.6.

IC-PCR with internal control

The following protocol is adapted protocol from Basto et al. (2) and consists of a first-round PCR reaction with an Internal Control, using the primers 72ARs and 72ARas (specific for conserved regions of the VP72 gene B646L) followed by a nested PCR reaction using the primers 72Ns and 72Nas. The first-round PCR fragment obtained by amplification of ASFV DNA has a length of 370 bp. The Internal Control is a plasmid (p72AR-ICg) with the same primer recognition sequences as the viral DNA, but flanking a heterologous DNA fragment of larger size (498 bp). The nested PCR reaction amplifies a 243 bp fragment from the ASFV DNA. The Internal Control plasmid can be obtained from the IAH or directly from Carlos Martins (e-mail: cmartins@fmv.utl.pt) or Afonso Basto (e-mail: abasto@fmv.utl.pt).

Material needed:

- Nuclease-free water
- PCR Mastermix (we recommend to use the Eppendorf MasterMix 2.5x, it is stable, relatively cheap and easy to handle)
- Primers: prepare primers stock solutions at a concentration of 10 pmol/μl
- **First-Round PCR Primers:** 72ARs (forward): 5'-GAC GCA ACG TAT CTG GAC AT-3'
72ARas (reverse): 5'-TTT CAG GGG TTA CAA ACA GG-3'
- **Nested PCR Primers:** 72Ns (forward): 5'-TAC TAT CAG CCC CCT CTT GC-3'; 72Nas (reverse): 5'-AAT GAC TCC TGG GAT AAA CCA T-3'
- **Internal Control:** before using the internal control, the lower amount of plasmid that proves to be consistently amplified in the PCR must be determined. For this purpose:
 - Prepare 10-fold serial dilutions of the plasmid in nuclease-free water.
 - Run PCR reactions under the conditions described bellow, using 0.5 μl of each plasmid dilution as template and substituting the sample template by water.
 - Load the PCR products on an agarose gel containing Ethidium Bromide. Examine the gel under a UV light source and observe which were the last two dilutions giving positive amplification.
 - Run new PCR reactions (same conditions) using as templates those last two plasmid dilutions that gave positive amplifications, but this time with 10 replicates of each one.
 - After running the PCR and the agarose gel, examine under UV light and observe which of the dilutions gave positive amplification in ALL the replicates. The highest dilution (lower concentration) of plasmid that proved to be consistently amplified is the right concentration to use as internal control in PCR reaction. If needed, dilute more plasmid at this concentration and store it at -20 °C.
- **Marker DNA:** marker DNA are commercial available. Take in consideration the size of the expected amplification products (498 bp for the internal control; 370 bp for the first-round PCR product and 243 bp for the nested PCR product).

a) First-round PCR with Internal Control

- Prepare a PCR mix in a sterile 1.5 ml microcentrifuge tube. This mix should contain the following reagents volumes multiplied by the number of samples to be assayed plus 3 or 2 times for control tubes (see note bellow), the total volume per reaction is 50 μl:
 - 20 μl Eppendorf MasterMix 2.5x,
 - 10.5 μl Nuclease-free water,
 - 4 μl Primer 72ARs 10 pmol/μl
 - 4 μl Primer 72ARas 10 pmol/μl
- Transfer 34.5 μl of the PCR mix to a 0.2 ml PCR tube, which will be the negative control. Add to this tube 15.5 μl of nuclease-free water.
- Add to the PCR mix prepared 0.5 μl of internal control (highest dilution of the plasmid that proved to be consistently amplified, as shown above), multiplied by the number of samples to be assayed plus 2 times for control tubes (see note bellow).
- Add 35 μl of the PCR mix to the required number of 0.2 ml PCR tubes (one for each sample to be assayed and 2, see note, for control tubes).

- Add 15 µl of extracted sample template to each PCR tube. For the positive control, use 2 µl of ASFV DNA and 13 µl of nuclease-free water. Run a negative control (15 µl nuclease-free water) to certify that the Internal Control solution is not contaminated by ASFV DNA.

***Note:** since the control tube with only internal control (without ASFV DNA) is sufficient as positive control of the reaction, the only purpose of the positive control tube with internal control and ASFV DNA is to compare the size of the fragment obtained by amplification from the viral DNA (370 bp) with the size of amplification products obtained from a positive sample. In these circumstances, the control tube with internal control plasmid and ASFV DNA can be dispensed, if extra ASFV DNA manipulation is to be avoided.*

- Place all the tubes in an automated DNA thermal cycler and run the following programme:
 - 1 cycle at 95°C for 7 minutes.
 - 35 cycles at 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds.
 - 1 cycle at 72°C for 10 minutes
 - Hold at 4°C.
- Load all the samples on an agarose gel containing Ethidium Bromide and examine the gel under a UV light source.
- Reading the results: calculate the size of the PCR products in the test samples and the positive control by reference to the standard markers.
 - A band of 498 bp, corresponding to the Internal Control, should be present in all the samples, except in the Negative Control. The PCR reaction of the samples where this band is not present was inefficient, probably as consequence of PCR inhibitors in the sample tested. Try to extract again the DNA or dilute the sample.
 - In the Positive Control, in addition to the band corresponding to the internal control, another band with 370 bp will be present, corresponding to the viral DNA.
 - In a positive sample, the same two bands observed in the Positive control will be present. If the amount of viral DNA is too high, it is possible that the band of the Internal Control is not visible.
 - In the Negative Control for the Internal Control, only the Internal control band should be present. If the band corresponding to viral DNA is also observed it means that the plasmid solution is contaminated and the other positive results are not valid.
 - No bands should be seen in the negative control.

b) Nested PCR

- Prepare a PCR mix in a sterile 1.5 ml microcentrifuge tube. This mix should contain the following reagents volumes multiplied by the number of samples to be assayed plus 2 times for control tubes:
 - 10 µl Eppendorf MasterMix 2.5x
 - 10 µl Nuclease-free water
 - 2 µl Primer 72Ns 10 pmol/µl
 - 2 µl Primer 72Nas 10 pmol/µl
- Add 24 µl of the PCR mix to the required number of 0.2 ml PCR tubes, run a positive and a negative control.
- Transfer 1 µl amplification product of each first-round PCR tube to each nested PCR tubes.
- Place all the tubes in an automated DNA thermal cycler and run the following programme:
 - 1 cycle at 95°C for 7 minutes.
 - 35 cycles at 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds.
 - 1 cycle at 72°C for 10 minutes.
 - Hold at 4°C.
- Load all the samples on an agarose gel containing ethidium bromide and examine under a UV light.source.
- Reading the results: Calculate the size of the PCR products in the test samples and the positive control by reference to the standard markers.
 - The PCR product of the positive control has a size of 243 base pairs
 - In a positive sample, a band will be present that should co-migrate with the PCR product of the positive control.
 - No bands should be seen in the negative control.
 - A faint band of 498 bp, corresponding to the internal control amplified in first-round PCR, may be seen in all samples transferred from first-round PCR.

PCR on Whatman 3M or FTA filter paper

Having samples on both types of filter paper will allow assessing which one is better to use. Experiments carried out at the IAH indicated that ASF virus could be detected down to a virus titre of 10^3 /ml from both filter papers.

Use the protocols described in 3.2.2. For the first-round PCR use a final volume of 25 µl:

- 10 µl Eppendorf Mastermix 2.5x,
- 9.5 µl Nuclease-free water,
- 2 µl Primer 72ARs 10 pmol/µl,
- 2 µl Primer 72ARs 10 pmol/µl
- 0.5 µl Internal Control

Add the filter paper discs into the PCR tubes (minimum 1 disc of 2mm diameter ~ 1 µl of sample DNA) and run the PCR as described above (3.2.2). The use of the internal control is facultative, however it is useful to assess the presence of PCR inhibitors.

Run the nested PCR on negative samples of the first-round PCR following the protocol described in section 3.2.2.

PCR on whole ticks

After DNA extraction of homogenized ticks, use the protocol 3.2.2 (IC-PCR with internal control: Basto et al 2006 (2)).

PCR on tissue

After DNA extraction of tissue, use the protocol 3.2.2. (IC-PCR with internal control: Basto et al 2006) or the protocol 3.2.2.

Other PCR protocols

- Aguerro et al. 2003 (1) : Highly sensitive PCR assay for routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples
- Michaud et al., 2004, (7) Journees Recherche Porcine, 36, 323-326 : protocol for direct PCR for ASFV from Whatman 3M filter paper
- King et al. 2003 (6): Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus

Anti-ASF virus antibody detection

We recommend to perform the two different ELISA tests described below on each sample, as this will allow the direct comparison of the two tests and therewith a sound test evaluation. The Ingenasa ASF serological kit has been used a lot in the past and as it is commercially available, it allows to all laboratories to get uniform supply. The p30-ELISA is new and has not been thoroughly tested on samples from different regions. However analysis of samples from Spain and West Africa were very promising and indicated that this test has a higher specificity. In addition the antigen can be adapted to local strains, which seems to be most of all interesting for Eastern African countries.

For doubtful ELISA samples we recommend to use Western Blot Strips (delivered by Jose Escibano, see 3.3.3.)

Ingenasa ASF serological kit

The Ingezim PPA Compac 1.1.PPA K3 Elisa kit is a blocking enzymatic immunoassay (Blocking ELISA) using a purified protein extract from the virus (VP73) as antigen. Kits can be ordered from Ingenasa, Madrid (Spain), e-mail cvela@ingenasa.es. The delivered kit contains the following components:

96-well micro-titration coated plates, vials with inactivated positive control serum, vials with inactivated negative control serum, vials with peroxidase conjugate (100x concentrated), diluent (DEO1-01), substrate (TMB), stop solution.

Materials and reagent needed that are not provided with the kit: distilled or deionized water, micropipets from 5 to 200 µl, disposable micropipette tips, washing plates device, test tubes from 50 to 250 ml, ELISA Reader (450nm filter).

Test procedure:

- All reagents (except conjugate) must be allowed to come to room temperature before use.
- Add 50 µl of supplied diluent to each well. Add 50 µl of positive control sera to two wells (e.g. A1 and B1), and 50 µl of the negative control sera (e.g. A2 and B2). Add 50 µl of sera samples to test on each remainder wells. We recommend the use of two wells per sample. Seal the plate and **incubate for 1 h at 37°C or overnight (18 hours) at 18-25°C**.
- Empty the wells into a receptacle containing 0.1 M NaOH and wash 4 times as specified in point V.
- Add 100 µl of specific conjugate (prepared following previous instructions) to each well. Seal the plate and **incubate for 30 minutes at 37°C**.
- Wash 5 times as previously described
- Add 100 µl of substrate to each well. Keep the plate for 15 min at room temperature.
- Add 100 µl of stop solution, to each well.
- Read the OD of each well at 450nm

Reading and interpretation of the results:

The test can be considered valid when the OD of the negative control (NC) is higher than 0.7 and, at least, 4 times higher than the OD of the positive control (PC): $NC/PC > 4$

Cut-off calculation: Positive cut-off = $CN - [(CN - CP) \times 0.5]$
 Negative cut-off = $CN - [(CN - CP) \times 0.4]$

When running duplicates, the OD of the sample will be calculated as the arithmetic mean of OD values in both wells.

- Serum samples with an OD lower than the positive cut-off, are considered as positive to ASFV antibodies.
- Serum samples with an OD higher than negative cut-off, will be considered negative to ASFV antibodies.

Serum samples with OD values between both cut off are considered as doubtful. We recommend re-testing these animals one more time or applying a different technique to check this serum (Western blot, Indirect ELISA, etc.).

Algenex anti-rp30 ELISA

This protocol has been described by Perez-Filgueria et al. (9). Lyophilized recombinant p30 antigen in vials for 3-4 micro-titre plates can be obtained from Jose Escribano (email: escriban@inia.es). Coat the ELISA micro-plates (Polysorp, Nunc, Denmark) with 100 µl antigen (positive and negative) of a 1:3,000 dilution in 50 mM carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6 and incubate overnight at 4°C. The next day, wash the plates with PBST three times and use immediately or store at -20°C until use. The following incubations are for 1 h at 37°C under constant agitation. Incubate plates sequentially with blocking buffer (PBST - 2% BSA, 50 µl/well) and pig serum samples diluted 1:200 in blocking buffer in duplicate wells. Each serum sample is tested against both Ag(+) and Ag(-). Wash plates four times with PBST and

ad 50 µl/well of protein A-HRP conjugate (Sigma, Missouri, USA) diluted 1:2000. For the substrate reaction, wash the plates 4 times and ad 50 µl/well of substrate solution consisting of 1mM 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (KPL, USA), 35mM citric acid, 67 mM Na₂HPO₄ pH=5.0 and 0.015% H₂O₂. Allow peroxidase reaction to develop for 15 min at room temperature, stop reaction and read at 405 nm in an ELISA microplate reader (Multiskan EX, Thermo Electron Corp., USA). Sera titers are expressed as the ratio between the mean OD obtained for each sample in duplicate assays against Ag(+) and Ag(-) [OD Ag(+)/OD Ag(-)]. Ratios higher than 2 are considered positive.

Buffers required:

Carbonate/bicarbonate buffer 0.05M (pH 9.6)

| | |
|---|--------|
| Na ₂ CO ₃ (Merck 1.06392) | 1.59 g |
| NaHCO ₃ (Merck 6329) | 3.88 g |
| Distilled water to | 1000ml |

Store at 4°C. Check the pH before use.

Washing solution: PBS 1x pH 7.2 - 0.1% Tween-20 (PBST)

| | |
|---|---------|
| NaCl (Merck Ref. 1.06404) | 8.0 g |
| KH ₂ PO ₄ (Merck Ref. 1.04873) | 0.2 g |
| Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O (Merck Ref. 1.06586) | 2.9 g |
| KCl (Merck Ref. 1.04936) | 0.2 g |
| Tween-20 (Merck Ref. 8.22184) | 1 ml |
| Distilled water to | 1000 ml |

Check the pH before use it. Store at + 4°C.

Blocking solution:

2% (w/v) BSA in PBS 1x pH 7.2 - 0.1% Tween-20

Substrate: ABTS

Buffer solution 1x: citric acid 35 mM

Na₂HPO₄ 67 mM

5.0 pH

1mM ABTS in buffer pH 5.0 (dissolved immediately before being used) and 0.015% H₂O₂

Example: 15 ml buffer 1x + 6.75 µl H₂O₂ (al 33%) + 8.2 mg ABTS.

Western Blot

rp30-based immunoblotting assay

Use Western blot strips provided by Jose Escribano (email: escriban@inia.es). Block strips for 1h with PBST 4% skim milk and subsequently incubate for 1 h at room temperature with pig sera diluted 1:50 and a protein A-horse radish peroxidase (HRP) conjugate (Sigma, USA) at a 1:2000 dilution in blocking buffer. Develop assays using 0.3% 4-chloronaphtol solution (Sigma, USA) as substrate and stop reaction with distilled water after 5 minutes.

Interpretation of results: Sera presenting a characteristic reaction with a protein band corresponding to protein p30 are considered positive to ASF antibodies.

Buffers required:

PBS buffer pH 7.2

| | |
|---|---------|
| NaCl (Merck 1.06404) | 8.0 g |
| KH ₂ PO ₄ (Merck 1.04873) | 0.2 g |
| Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O (Merck 1.0686) | 2.9 g |
| KCl (Merck 1.04936) | 0.2 g |
| Distilled water to | 1000 ml |

Check the pH before use. Store at 4°C.

PBS 1x pH 7.2- 0.1% Tween 20 (PBST)

| | |
|--------------------|------|
| Detergent Tween 20 | 1 ml |
|--------------------|------|

PBS pH 7.2

1 L

PBST/Milk 4% buffer

Non fat dry milk (NESTLÉ- Sveltesse or Molico) 4 g

PBST pH 7.2

100 ml

Store at + 4°C. Do not use it after two days.

Substrate solution

a) Dissolve 12 mg of 4-chloronaphtol (Merck 11952) in 4 ml of Metanol (Merck 1.06009).

b) Add slowly 4-chloronaphtol/Methanol solution to 20 ml of PBS buffer pH 7.2, with vigorous agitation (a characteristic precipitate is formed).

c) Then, add 8 µl of H₂O₂ 30% (Panreac 131058) to the PBS/4-chloronaphtol solution.

Anti-tick antibody detection

The anti-tick ELISA determines if a pig has been bitten by *O. moubata* or *O. erraticus*. The antigen is tick salivary gland. The test can be useful to evaluate the importance of the tick cycle for the transmission in a pig population.

The protocol has been developed for the detection of anti-*O. erraticus* antibodies in pigs (4). Based on this protocol, an ELISA for anti-*O. moubata* antibodies can be carried out. The *O. moubata* antigen can be obtained from the IAH.

Genotyping

All sequences should be uploaded to the website maintained by EU Reference Laboratory for African Swine Fever in Valdeolmos, Madrid/Spain (<http://webainia.inia.es/cisa/asfv/index.asp>). The main objective of this database is to obtain epidemiological information of the ASFV isolates from all epidemics in or near the European Union, and from all over the world. In addition, the sequences from defined regions of the ASFV genome included in this database are a usefully tool for genetic typing of new isolates. This can be very important for comparing a sequence to existing sequences in the database. The database allows searching sequences by the viral isolate name, country or continent of origin, year of collection, or by host species.

Sequencing of p72 (B646L)

Use the primers described by Bastos et al. (3) to amplify a 478bp C-terminal region of the vp72 (p72-D 5`-GGC ACA AGT TCG GAC ATG T-3`, and p72-U 5`-GTA CTG TAA CGC AGC ACA G-3`)

.

Sequencing of 9RL (B602L)

The sequencing of 9RL allows to distinguish within p72 groups: either use primers described by Irusta et al. (5) or Nix et al. (8)

ORF9L-F2 (5`-CAT CCG GGC CGG TTT CTT GTA TAT-3`) and ORF9L-R3 (5`-GGA GTT TG GTG ATT GCA TCA ATA TCG-3`).

Optional genotyping methods

Sequencing of p30 (CP204L) gives further information regarding the genotype (protocol Emmanuel Albina). The analysis of variable genome regions has also shown to be a useful approach, see Nix et al.(8).

References

1. **Aguero, M., J. Fernandez, L. Romero, C. Sanchez Mascaraque, M. Arias, and J. M. Sanchez-Vizcaino.** 2003. Highly sensitive PCR assay for routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* **41**:4431-4.
2. **Basto, A. P., R. S. Portugal, R. J. Nix, C. Cartaxeiro, F. Boinas, L. K. Dixon, A. Leitao, and C. Martins.** 2006. Development of a nested PCR and its internal control for the detection of African swine fever virus (ASFV) in *Ornithodoros erraticus*. *Arch Virol* **151**:819-826.
3. **Bastos, A. D., M. L. Penrith, C. Cruciere, J. L. Edrich, G. Hutchings, F. Roger, E. Couacy-Hymann, and R. T. G.** 2003. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Archives of Virology* **148**:693-706.
4. **Canals, A., A. Oleaga, R. Perez, J. Dominguez, A. Encinas, and J. M. Sanchez-Vizcaino.** 1990. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific antibodies in pigs infested with the tick *Ornithodoros erraticus* (Argasidae). *Veterinary Parasitology* **37**:145-53.
5. **Irusta, P. M., M. V. Borca, G. F. Kutish, Z. Lu, E. Caler, C. Carrillo, and D. L. Rock.** 1996. Amino acid tandem repeats within a late viral gene define the central variable region of African swine fever virus. *Virology* **220**:20-7.
6. **King, D. P., S. M. Reid, G. H. Hutchings, S. S. Grierson, P. J. Wilkinson, L. K. Dixon, A. D. Bastos, and T. W. Drew.** 2003. Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J Virol Methods* **107**:53-61.
7. **Michaud, V., L. Dixon, L. Romero, M.-F. Le Potier, F. Roger, and E. Albina.** 2004. PCR directe pour la detection du genome du virus de la peste porcine africaine a partir de prelevements de sang sur buvard. *Journées Recherche Porcine* **36**:323-326.
8. **Nix, R., C. Gallardo, G. Hutchings, E. Blanco, and L. K. Dixon.** 2006. Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. in press.
9. **Perez-Filgueira, D. M., F. Gonzalez/Camacho, C. Gallardo, P. Resino, E. Blanco, E. Gomez-Casado, C. Alonso, and J. M. Escribano.** 2006. Validation of a recombinant serological diagnosis for African swine fever virus (ASFV) based on the p30 protein produced in *Trichoplusia ni* larvae. submitted.

ABSTRACT

African swine fever virus (ASFV) was introduced in Madagascar in 1998, from the south-eastern coast of Mozambique to the south-western part of the island, with a subsequent and rapid spread to other regions. This epizootic disease devastated more than the half of the domestic pig population in Madagascar with severe economic consequences especially for the local pork meat market. Then, it has evolved as an enzootic status, with different hypothetical causes such as ASFV adaptation to local resistant pig population, or its establishment and persistence in local *Ornithodoros* tick hosts, and finally its potential presence of the *Potamochoerus larvatus* which is also a host of the virus. These factors are supplemented by a lack of reliable sanitary measures to control ASFV epizootic foci.

In 2006-2008, investigations were conducted in three different areas of Madagascar (Marovoay region, Ambatondrazaka and Antananarivo where Arivonimamo and Mahitsy are included), in order to assess the epidemiological role of the sylvatique cycle (soft tick and bushpig) and estimate the risk of virus introduction by these wild hosts in an attempt to explain the enzootic persistence of the disease since its introduction in 1998.

The present study confirmed the presence of the *O. porcinus* in Madagascar, but only in the same pigsty in Mahitsy, in the Antananarivo zone, where soft ticks were collected during the 2000 epizootic phase. The noticeable restricted geographical distribution of *O. porcinus* in Madagascar may be multi-factorial.

It was also shown that these ticks were phylogenetically related to the Tanzanian *O.moubata* ticks and *O.porcinus domesticus*, as previously suggested by Uilenberg in 1963.

Within this study, the detection of the virus infections in the ticks collected in 2000 and 2007-2008 with a mean rate of 8,175%, without introduction of the pigs potentially infected during at least four years, explains the of long-term persistence of the virus in the Malagasy *O.porcinus domesticus* ticks. For the first time, evidence is given that *O. porcinus* in Madagascar may be a competent vector and a natural reservoir for ASFV. Laboratory experimental infections, for Malagasy soft ticks at CIRAD Montpellier, will allow confirmation of such assumptions.

However, in our bushpig samples no virus was detected; the prevalence in Malagasy bushpig was estimated between 0% to 8% with 95% confidence. In fact, our findings suggest that the role of the Malagasy bushpig in the ASF epidemiology is negligible since there was also no contact between soft ticks *O.porcinus* and the vertebrate host *Potamochoerus larvatus*.

In Madagascar, the risk of the virus introduction in domestic pig through bushpig and soft tiques is qualified as low.

Key words: African swine fever virus, Madagascar, Mahitsy, *Ornithodoros porcinus*, *Ornithodoros porcinus domesticus*, *Potamochoerus larvatus*,

RESUME

Le virus de la peste porcine africaine ou PPA a été introduit dans le sud-est de Madagascar en 1998 à partir de la côte du sud-est du Mozambique. Il s'est ensuite propagé rapidement dans d'autres régions du pays. Cette maladie épizootique a alors dévasté plus de la moitié de la population de porcs domestiques de Madagascar avec des conséquences économiques graves surtout pour le marché local de viande de porc. La maladie a ensuite évolué vers un statut enzootique, diverses hypothèses ont été avancées pour expliquer ce changement : adaptation des populations résistantes de porc, surtout de race locale ; présence et persistance du virus dans des hôtes sauvages comme la tique molle du genre *Ornithodoros*. En outre, la présence dans certaines zones de *Potamochoerus larvatus*, un hôte sauvage du virus, ainsi que le manque de mesures sanitaires fiables rendent difficiles la lutte et le contrôle de la maladie dans le pays.

En 2006-2008, des investigations ont été conduites dans trois régions de Madagascar (région de Marovoay, Ambatondrazaka, et région des Hauts -Plateaux vers Arivonimamo et Mahitsy), afin d'évaluer le rôle épidémiologique de la tique molle et du potamochère. Elles doivent permettre d'estimer le risque de transmission du virus de la PPA au porc par ces hôtes sauvages, transmission qui pourrait expliquer la persistance enzootique de la maladie depuis son introduction en 1998. L'étude conduite a pu confirmer la présence de tiques molles de l'espèce *Ornithodoros porcinus* à Madagascar retrouvées dans la même porcherie de la zone d'Antananarivo-Mahitsy où elles avaient été collectées pendant la phase épizootique, en 2000. La répartition géographique apparemment restreinte de ces tiques à Madagascar peut être multifactorielle. Il a été également montré que ces tiques sont proches phylogénétiquement des tiques tanzaniennes *O. moubata* et qu'elles sont étroitement liées à l'espèce *O. porcinus domesticus* comme précédemment suggéré par Uilenberg en 1963.

La détection de l'infection virale, avec un taux de 9,52%, chez les tiques collectées en 2000 et de 6,83% chez celles récoltées en 2007-2008 (alors qu'il n'y a pas eu d'introduction de porcs potentiellement infectés au cours des quatre années précédentes, entre 2003 et 2007) illustre la capacité de persistance à long terme du virus chez les tiques *O. porcinus domesticus* malgaches. Pour la première fois, il est démontré que les tiques molles *O. porcinus domesticus* peuvent être un vecteur compétent et un réservoir naturel pour le virus de la PPA à Madagascar. Les infections expérimentales de tiques qui seront réalisées au laboratoire du CIRAD à Montpellier permettront d'approfondir ces résultats.

Au cours de notre étude, aucun virus ni anticorps dirigés contre le virus n'ont été détectés respectivement dans les échantillons de rate et de sérum de potamochères analysés. Il a été en conséquence suggéré que le rôle du potamochère dans l'épidémiologie de PPA à Madagascar serait négligeable d'autant qu'il n'existe apparemment aucun contact entre les tiques molles *O. porcinus domesticus* et le *Potamochoerus larvatus*. A Madagascar, le risque d'introduction du virus chez le porc domestique par l'intermédiaire du potamochère et des tiques molles est considéré comme faible.

Mots clés : Peste porcine africaine, Madagascar, Mahitsy, *Ornithodoros porcinus*, *Ornithodoros porcinus domesticus*, *Potamochoerus larvatus*